

Universidad de Huelva

**Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”**



**Combinación de metodologías ómicas y mea-ómicas para
estudiar el efecto de la suplementación de selenio y su
interacción con la microbiota intestinal**

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Sara Ramírez Acosta

Fecha de lectura: 16 de septiembre de 2022

Bajo la dirección de los doctores:

Tamara García Barrera

José Luis Gómez Ariza

Francisco Navarro Roldán

Huelva, 2022



TESIS DOCTORAL

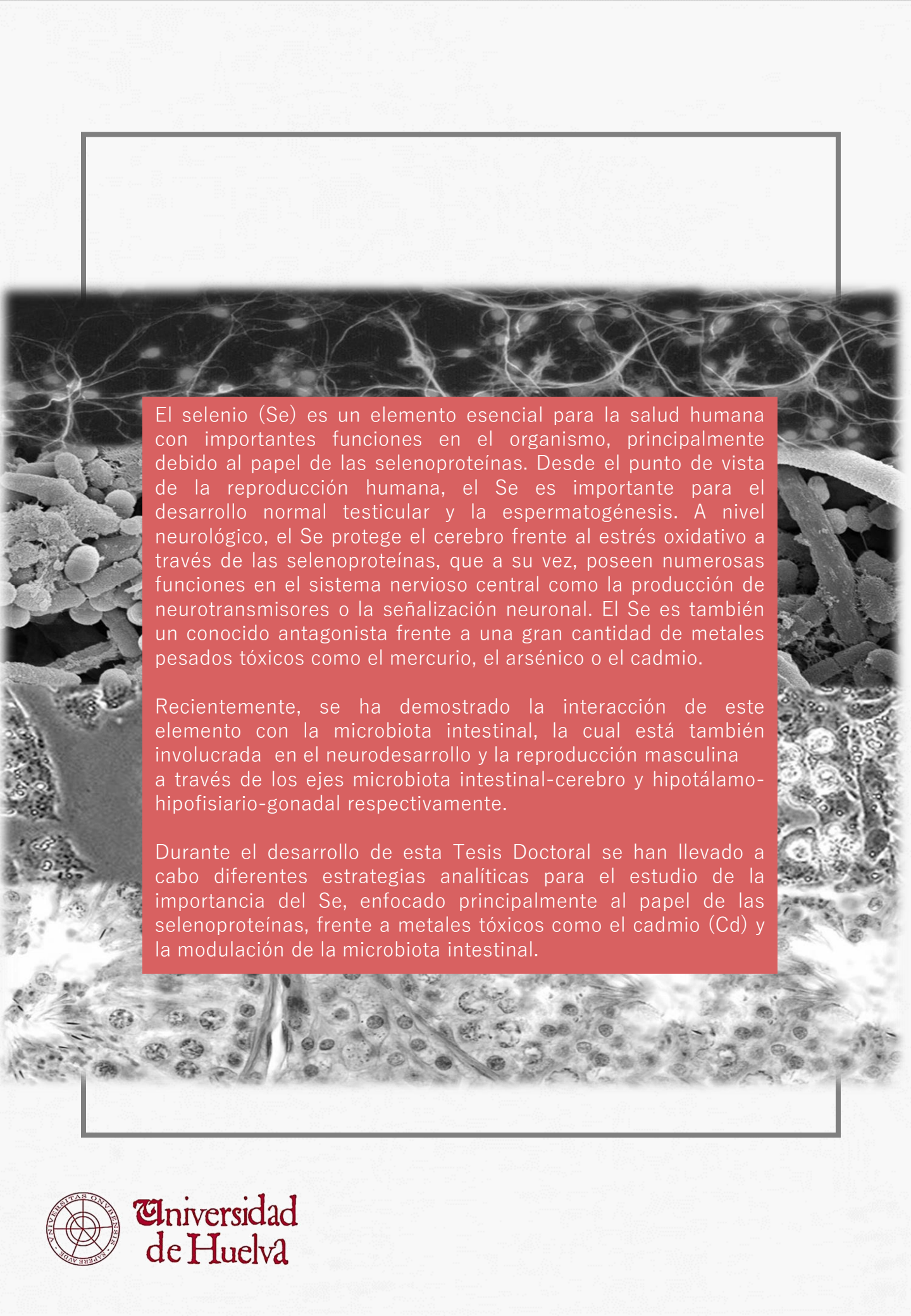
**Combinación de
metodologías ómicas y
meta-ómicas para
estudiar el efecto de la
suplementación de
selenio y su
interacción con la
microbiota intestinal**

Sara Ramírez Acosta

Huelva, 2022



**Universidad
de Huelva**

A grayscale electron micrograph of neural tissue, showing a dense network of fine, branching processes (likely dendrites or axons) and larger, more rounded cellular structures. A semi-transparent red rectangular box is overlaid on the center of the image, containing white text.

El selenio (Se) es un elemento esencial para la salud humana con importantes funciones en el organismo, principalmente debido al papel de las selenoproteínas. Desde el punto de vista de la reproducción humana, el Se es importante para el desarrollo normal testicular y la espermatogénesis. A nivel neurológico, el Se protege el cerebro frente al estrés oxidativo a través de las selenoproteínas, que a su vez, poseen numerosas funciones en el sistema nervioso central como la producción de neurotransmisores o la señalización neuronal. El Se es también un conocido antagonista frente a una gran cantidad de metales pesados tóxicos como el mercurio, el arsénico o el cadmio.

Recientemente, se ha demostrado la interacción de este elemento con la microbiota intestinal, la cual está también involucrada en el neurodesarrollo y la reproducción masculina a través de los ejes microbiota intestinal-cerebro y hipotálamo-hipofisiario-gonadal respectivamente.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo diferentes estrategias analíticas para el estudio de la importancia del Se, enfocado principalmente al papel de las selenoproteínas, frente a metales tóxicos como el cadmio (Cd) y la modulación de la microbiota intestinal.



UNIVERSIDAD DE HUELVA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

“Prof. José Carlos Vilchez Martín”

**COMBINACIÓN DE METODOLOGÍAS ÓMICAS Y
META-ÓMICAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE
LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO Y SU
INTERACCIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL**

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIA Y TECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR:

Sara Ramírez Acosta

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Tamara García Barrera

José Luis Gómez Ariza

Francisco Navarro Roldán

Huelva, 2022



**Universidad
de Huelva**

COMBINACIÓN DE METODOLOGÍAS ÓMICAS Y META-ÓMICAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO Y SU INTERACCIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL

DIRECTORES:

Fdo. Tamara García Barrera

Catedrática de Universidad

Fdo. José Luis Gómez Ariza

Catedrático de Universidad

Fdo. Francisco Navarro Roldán

Prof. Titular de Universidad

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctora por la Graduada:

Fdo. Sara Ramírez Acosta

Graduada en Química

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis Directores de Tesis, Tamara García Barrera, José Luis Gómez Ariza y Francisco Navarro Roldán de la Universidad de Huelva por confiar en mí para llevar a cabo el trabajo de investigación de la presente Tesis. Gracias por vuestros consejos, orientaciones, dedicación y paciencia a lo largo de tantos años, y muy en especial a Tamara García por el último empuje para la finalización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de una ayuda predoctoral de formación de personal investigador (BES-C-2016-0055) que ha permitido la financiación de esta Tesis Doctoral.

Gracias a la Dra. Nieves Abril de la Universidad de Córdoba, Dra. M^a Carmen Collado y Dra. Marta Selma del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) por vuestra colaboración, conocimientos y aportación en la investigación de esta Tesis Doctoral.

Quisiera agradecer a mi supervisor de la Unidad de Investigación de Analítica BioGeoQuímica (BGC) del Helmholtz Zentrum München (Alemania), Bernhard Michalke, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y de aprender nuevas técnicas instrumentales que han contribuido a mi formación en el análisis de especiación elemental. Al resto de compañeros de BGC, Peter, Heidi, Bärbel y Basti, por hacerme sentir una más del grupo, *danke!*

Los días gélidos alemanes no hubiesen sido lo mismo sin todos aquellos que me han hecho sentir como si estuviera en casa. Guardo con especial cariño la compañía de Samu, con quién he podido compartir la experiencia de trabajar juntos en el Helmholtz Zentrum y ser turistas los fines de semana.

A mis compañeras del grupo de Análisis Medioambiental y Bioanálisis (AMB) de la Universidad de Huelva, Gema Rodríguez, Belén Callejón y Ana Arias que han estado desde los inicios de esta Tesis Doctoral y a todos aquellos que alguna vez pasaron por AMB y con los que he compartido tantos momentos. Me gustaría hacer una mención especial a mis antiguas compañeras Paqui Arellano y Tania Muñoz, con quienes ahora comparto una verdadera amistad. Mil gracias por vuestro apoyo, ánimos, risas, llantos, festivales, meriendas en La Grosera, viajes y todas las cosas buenas que nos quedan por compartir juntas las tres.

A mis '*Partners in WOD*' de CrossFit y Club Halterofilia Huelva 2013 por 'salvarme de la locura' de esta Tesis Doctoral durante las horas de entreno.

A mi familia, Titi, Tía Francis y Pablo, pero sobre todo a mi abuela Teresa, por esa fe ciega en mí durante todos mis estudios, por su preocupación y cariño en cada paso que decidía dar. Gracias también a mi 'otra familia' por todo su apoyo y darme los mejores recuerdos de mi vida junto a vosotros: tía Tere, tíos Juan y M^o Dolores, tíos Francis y Rocío, tíos Eugenio y M^o José y tía M^o Carmen. A Natalia y Marta, por llevar 30 años juntas y considerarlas como mis hermanas. No me imagino la vida sin vosotras dos a mi lado. Os quiero a todos.

Por último, a las personas más importantes de mi vida, mis padres, Antonio y Amparo. Vosotros sois quienes verdaderamente habéis hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, inculcándome vuestros valores, sabiduría y consejos. Me habéis dado la libertad para tomar mis propias decisiones y encontrara mi camino, siempre con vuestro apoyo, dándome la fuerza y el empuje en los momentos de flaqueza (que han sido muchos). Me enseñasteis que un mal resultado no es un error, sino un aprendizaje y esta Tesis Doctoral está basada en un largo aprendizaje. Siempre me calmabais y me decíais que 'las cosas ya vendrán', y finalmente se cumple una de ellas. Nunca será suficiente mi agradecimiento.

A mis padres y abuela Teresa

ÍNDICE

Resumen/Summary.....	3
Introducción	11
1. Selenio.....	13
1.1. Propiedades fisicoquímicas del selenio	13
1.1.1 Presencia de selenio en el medio ambiente	14
1.1.2 Fuentes de selenio en la dieta	16
1.1.3 Suplementación de selenio.....	18
1.2 Metabolismo del selenio en mamíferos.....	19
1.3 Selenoproteínas.....	21
1.3.1 Técnicas analíticas para la cuantificación de selenoproteínas	25
1.4 Importancia biológica del selenio	35
1.4.1 Deficiencia de selenio.....	38
1.4.2 Toxicidad y exceso de selenio.....	38
1.4.3 Selenio, fertilidad y salud reproductiva.....	39
1.4.4 Selenio, neurodesarrollo y enfermedades neurológicas.....	41
1.5 Interacciones biológicas del selenio	44
1.5.1 Interacción Cd/Se.....	44
1.5.2 Modelos <i>in vitro</i> para estudios Cd/Se. Líneas celulares	46
2. Ciencias ómicas	48
2.1 Metabolómica	49
2.1.1 Aproximaciones metodológicas utilizadas en metabolómica	49
2.1.2 Técnicas analíticas en metabolómica	52
2.1.3 Espectrometría de masas para estudios metabolómicos	53
2.1 Espectrometría de masas para la determinación multielemental y selenoproteínas	60
3. Microbiota intestinal	64
3.1 Microbiota intestinal y neurodesarrollo. Eje intestino-cerebro (GBA).....	65
3.2 Microbiota intestinal y reproducción masculina	67
3.3 Microbiota intestinal y elementos tóxicos/esenciales	69
3.4 Análisis de la microbiota: metodologías meta-ómicas.....	74

3.4.1 Metataxonómica	74
3.4.2 Metatranscriptómica	76
3.4.3 Metaproteómica	76
4. Referencias	78
Objetivos	119
Experimental	125
1. Instrumentación Analítica	127
1.1. Instrumentación empleada para los cultivos celulares	127
1.2. Instrumentación empleada para el análisis de metales traza	127
1.3. Instrumentación empleada para la especiación de selenoproteínas	128
1.4. Instrumentación empleada para los estudios metabolómicos	128
1.5. Instrumentación empleada para los estudios de la microbiota	129
1.6. Instrumentación empleada para el análisis de transcritos	129
1.7. Instrumentación empleada para la evaluación histopatológica	130
2. Reactivos y disoluciones	130
2.1. Reactivos y disoluciones de los cultivos celulares	130
2.2. Reactivos y disoluciones para el análisis de metales traza	130
2.3. Reactivos y disoluciones para la especiación de selenoproteínas	131
2.4. Reactivos y disoluciones para los estudios metabolómicos	131
2.5. Reactivos y disoluciones en estudios de la microbiota	132
2.6. Reactivos y disoluciones para el análisis de transcritos	132
2.7. Reactivos y disoluciones para la evaluación histopatológica	132
3. Estudios <i>in vitro</i> para evaluar el efecto protector de la SeMet sobre CdCl ₂	132
3.1. Preparación de las disoluciones	132
3.2. Mantenimiento de los cultivos	132
3.3. Conteo celular	133
3.4. Ensayos de viabilidad celular	134
3.5. Ensayo de exposición a CdCl ₂ y SeMet	135
3.6. Determinación del contenido total de Cd y Se en células y medios de cultivo	136
3.7. Especiación de selenoproteínas en células HepG2	138

3.8. Análisis estadísticos	140
4. Estudios <i>in vivo</i> para evaluar los efectos de la suplementación de selenio en las selenoproteínas y perfil metabólico. Influencia de la microbiota intestinal	140
4.1. Diseño experimental animal	140
4.2. Evaluación histopatológica de tejido testicular	141
4.3. Análisis de la microbiota intestinal	141
4.4. Determinación del contenido de metales traza en tejidos	142
4.5. Selenoproteínas	143
4.5.1 Especiación de selenoproteínas mediante 2D-SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-MS	143
4.5.2 Expresión de selenoproteínas mediante qRT-PCR	143
4.6. Análisis metabolómico no dirigido de muestras de cerebro	144
4.6.1 Tratamiento de muestras	144
4.6.2 Análisis de las muestras para la obtención del perfil metabolómico	145
4.6.3 Procesado de datos	147
4.7. Análisis estadístico	148
4.8. Identificación de compuestos y rutas metabólicas	149
4.9. Identificación de compuestos y rutas metabólicas	149
5. Referencias	150
Resultados y discusión	153
Capítulo I/Chapter I	155
Antagonistic interaction of selenium and cadmium in human liver cells through selenoproteins	157
Capítulo II/ Chapter II.....	181
Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota	183
Capítulo III/Chapter III.....	209
Omic methodologies for assessing metal(-loid)s-host-microbiota interplay: A review	211

The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metallomics, metabolomics, transcriptomics and microbiota profiling	233
Conclusiones/Conclusions	309
Anexos.....	315
Anexo I: Índice de figuras	317
Anexo II: Índice de tablas	321
Anexo III: Índice de abreviaturas.....	323

RESUMEN

SUMMARY

El selenio (Se) es un elemento esencial para la salud humana con importantes funciones para el organismo. Está presente de forma natural en el medio ambiente tanto en formas orgánicas como inorgánicas. En el organismo, se incorpora en forma de selenocisteína (Sec) durante la biosíntesis de la cadena polipeptídica dando lugar a las selenoproteínas. Los efectos biológicos del selenio están en gran parte mediados por las selenoproteínas, ya que se ha reconocido que es un factor clave en el sistema inmune, el metabolismo de hormonas tiroideas y el desarrollo neurológico entre otros. La principal fuente de Se en humanos es la dieta, siendo las nueces de Brasil, pescados y carnes alimentos ricos en este elemento. Una deficiencia de Se puede ocasionar diversas condiciones fisiopatológicas como enfermedades cardíacas, enfermedades neurológicas, cáncer, infertilidad y procesos inflamatorios. Por ello, a veces es necesaria la suplementación de Se de forma directa mediante el consumo de complementos alimenticios.

Desde el punto de vista de la reproducción humana, el Se es importante para el desarrollo normal testicular y la espermatogénesis. A nivel neurológico, el Se protege el cerebro del estrés oxidativo a través de las selenoproteínas, que a su vez, poseen numerosas funciones en el sistema nervioso central (CNS) como la producción de neurotransmisores o la señalización neuronal. El Se es un conocido antagonista frente a una gran cantidad de metales pesados tóxicos como el mercurio, el arsénico o el cadmio.

Por otro lado, el Se, interacciona con la microbiota intestinal, la cual actúa como barrera en la absorción, interviene en la metabolización de especies de Se e incluso determinados géneros incorporan Se a sus selenoproteínas. La microbiota intestinal constituye el conjunto de microorganismos (bacterias, virus, hongos y arqueas) presentes en el cuerpo humano. La microbiota intestinal está involucrada en funciones inmunológicas, fisiopatológicas y metabólicas del huésped e interactúa con otros órganos y tejidos. Desde hace unos años está cobrando especial interés la interacción intestino-cerebro, en lo que se conoce como el eje microbiota intestinal-cerebro (*gut-brain axis*), demostrándose que numerosos problemas neurológicos como el Alzheimer o la depresión están relacionados con

la alteración en la microbiota intestinal. Simultáneamente, la microbiota intestinal está relacionada con la producción de hormonas sexuales y disfunciones testiculares, teniendo un gran impacto en la reproducción masculina a través del eje microbiota intestinal-hipotálamo-hipofisiario-gonadal.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo diferentes estrategias analíticas para el estudio de la importancia del Se, enfocado principalmente al papel de las selenoproteínas, frente a metales tóxicos como el cadmio (Cd) y la modulación de la microbiota intestinal a través de los ejes microbiota intestinal-cerebro e hipotálamo-hipofisiario-gonadal.

La evaluación del efecto protector del Se frente al Cd se ha realizado mediante un ensayo de exposición en la línea celular de hígado HepG2 por ser uno de los órganos metabólicamente más activos y sobre los que ya se han realizado estudios previos *in vivo* con ratones *Mus musculus*. Para ello, las células fueron expuestas durante 24h a diferentes concentraciones de Cd en forma de CdCl₂ y de forma conjunta con Se en forma de selenometionina SeMet. Se determinó la viabilidad celular y la concentración de Cd y Se tanto en las células como los medios de cultivo. El contenido de selenoproteínas y selenometabolitos en las células HepG2 se determinó mediante la técnica de *column switching* y dilución isotópica de especies no específicas.

Para conocer el impacto de la suplementación de Se y la microbiota intestinal en el selenoproteoma de los tejidos de cerebro y testículos se ha llevado a cabo un ensayo de exposición a ratones *Mus musculus*. Los ratones fueron sometidos a un pre-tratamiento con antibióticos para obtener una microbiota deprimida y a un tratamiento posterior con dieta suplementada en Se. La microbiota intestinal ha sido caracterizada mediante un análisis metataxonómico. En ambos tejidos, cerebro y testículos, se ha optimizado un método de extracción de selenoproteínas para su posterior análisis. Los daños testiculares tras la depresión de la microbiota y el efecto de la suplementación de Se se determinaron mediante un análisis histopatológico de los tejidos.

Dada la importancia del eje microbiota intestinal-cerebro, se ha completado el estudio de las muestras de cerebro con un análisis metabolómico no dirigido empleando dos plataformas analíticas que han permitido abarcar un amplio rango de metabolitos. Además, se han analizado los niveles de expresión de todo el selenoproteoma de ratón mediante un análisis transcriptómico.

Los análisis de correlación entre la abundancia de la microbiota intestinal, selenoproteínas y los metabolitos han mostrado asociaciones con bacterias clave para la reproducción y el neurodesarrollo.

El conjunto de técnicas analíticas aplicadas en esta Tesis Doctoral ha aportado nueva información acerca de la respuesta biológica del organismo frente a la suplementación de Se, a través de los cambios en las selenoproteínas en modelos *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, los estudios de la microbiota han permitido profundizar en los mecanismos de interacción intestino-cerebro e intestino-testículo.

Selenium (Se) is an essential element for human health and crucial for body functions. It is naturally present in the environment in both organic and inorganic forms. In the body, it is incorporated in the form of selenocysteine (Sec) during the biosynthesis of the polypeptide chain, deriving to selenoproteins. The biological effects of selenium are largely mediated by selenoproteins, as it has been recognized to be a key factor for the immune system, thyroid hormone metabolism, and neurological development, among others. The main source of Se in humans is the diet, being Brazil nuts, fish, and meat foods rich in this element. A deficiency of Se can cause various pathophysiological conditions such as heart disease, neurological disease, cancer, infertility, and inflammatory processes. For this reason, sometimes it is necessary a Se supplementation directly through the consumption of food supplements.

From the point of view of human reproduction, Se is important for normal testicular development and spermatogenesis. At the neurological level, Se protects the brain from oxidative stress through selenoproteins, which in turn have numerous functions in the central nervous system (CNS) such as the production of neurotransmitters or neuronal signalling. Se is a well-known antagonist against many toxic heavy metals such as mercury, arsenic, or cadmium.

On the other hand, Se interact with the gut microbiota, which acts as a barrier to absorption, interferes in the metabolization of Se species, and certain genera incorporate Se into their selenoproteins. . The intestinal microbiota constitutes the set of microorganisms (bacteria, viruses, fungi, and archaea) present in the human body. The intestinal microbiota is involved in immunological, pathophysiological, and metabolic functions of the host and interacts with other organs and tissues. Recently, the interaction between the intestine and the brain, known as the gut-brain axis, has been gaining special interest, demonstrating that numerous neurological problems such as Alzheimer's or depression are related with alteration of the gut microbiota. Simultaneously, the gut microbiota is related to the production of sexual hormones and testicular dysfunctions, having a great impact on male reproduction through the gut microbiota-hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

During the development of this PhD Thesis, different analytical strategies have been carried out to study the importance of Se, mainly focused on the role of selenoproteins, against toxic metals such as cadmium (Cd) and the modulation of the microbiota through the gut microbiota-brain and hypothalamic-pituitary-gonadal axes.

The evaluation of the protective role of Se against Cd has been carried out by an exposure assay in the liver cell line HepG2, as it is one of the most metabolically active organs and on which previous *in vivo* studies employing *Mus musculus* mice have already been carried out. To this end, the cells were exposed for 24h to different concentrations of Cd in the form of CdCl₂ and in combination with Se in the form of selenomethionine SeMet. Cell viability and the concentration of Cd and Se were determined both in the cells and in the culture media. The content of selenoproteins and selenometabolites in HepG2 cells was analyzed using the column switching technique and isotopic dilution of non-specific species.

To determine the impact of Se supplementation and the intestinal microbiota on the selenoproteome of brain and testis tissues, an animal experiment using *Mus musculus* mice was carried out. Mice were pre-treated with antibiotics to obtain a depressed microbiota and subsequently treated with a Se-supplemented diet. The intestinal microbiota has been characterized by metataxonomic analysis. In both tissues, brain, and testes, a selenoprotein extraction method has been optimized for subsequent analysis. Testicular damage after microbiota depression and the effect of Se supplementation were determined by histopathological analysis of the tissues.

Given the importance of the gut-brain axis, the study of brain samples has been completed with an untargeted metabolomic analysis using two analytical platforms covering a wide range of metabolites. In addition, the expression levels of the entire mouse selenoproteome have been analyzed by transcriptomic analysis.

Correlation analysis between gut microbiota abundance, selenoproteins, and metabolites have shown associations with essential bacteria for reproduction and neurodevelopment.

The analytical techniques applied in this Doctoral Thesis has provided new information about the biological response of the organism to Se supplementation, through changes in selenoproteins both *in vitro* and *in vivo* models. Likewise, studies of the microbiota have made it possible to delve into the mechanisms of interaction between the gut-brain and intestine-testis.

INTRODUCCIÓN

1. Selenio

1.1. Propiedades fisicoquímicas del selenio

El Selenio (Se) fue descubierto en 1817 por Jöns Jacobs Berzelius y en colaboración con Johan Gottlieb Gahn en las fábricas de ácido sulfúrico de Gripsholm (Suecia). El por entonces propietario de la fábrica, M. Bjuggren, había notado la presencia de un sedimento rojizo en las cámaras de plomo cuando se usaba piritita (sulfuro de hierro) de las minas de Falun. En un principio se creyó que el compuesto era arsénico y se desechó su uso en la producción. Sin embargo, Gahn y Berzelius analizaron el sedimento rojizo que en un principio indicaba la posible presencia de telurio ya que desprendía un olor característico y exclusivo de este elemento. Dudoso de sus resultados, Berzelius, repitió los experimentos en su laboratorio de Estocolmo a principios de 1818 y concluyó que ese sedimento rojo contenía un nuevo elemento. Le impuso el nombre de selenio, derivado de la palabra griega *se/ene* que significa luna, por la analogía que tiene con el telurio, derivado de *Tellus*, tierra [1,2].



Figura 1. Apariencia del selenio

En la tabla periódica el selenio se localiza en el grupo 16 junto con el oxígeno, azufre, telurio y polonio. A diferencia del oxígeno y el azufre que son elementos no metálicos, el selenio es un metal con algunas propiedades metaloides como brillo en un alótropo y su carácter de semiconductor. Está presente de forma natural en algunos minerales y posee varias formas alotrópicas. En el medio ambiente se encuentra en estado elemental (Se_0), o en forma de seleniuros (Se^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}), o selenito (SeO_3^{2-}). De los seis isótopos estables que posee el Se, los más abundantes en la naturaleza son el ^{80}Se (49.6%) y ^{78}Se (23.8%) [3]. Las propiedades físicas y químicas del selenio se detallan en la Tabla 1:

Propiedades fisicoquímicas del Se	
Grupo	16
Periodo	4
Bloque	p
Número atómico	34
Estado a 20°C	sólido
Configuración electrónica	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁴
Punto de fusión	220.8° C, 429.4° F, 494 K
Punto de ebullición	685° C, 1265° F, 958 K
Densidad (g·cm ⁻³)	4.809
Masa atómica relativa	78.971
Isótopos	⁷⁴ Se, ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se y ⁸² Se
Estados de oxidación	-II, 0, IV, VI

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del selenio.

1.1.1 Presencia de selenio en el medio ambiente

El Se es liberado al medioambiente como consecuencia de los procesos antropogénicos y las fuentes naturales, encontrándose en rocas, suelos, aire y agua (Figura 2).

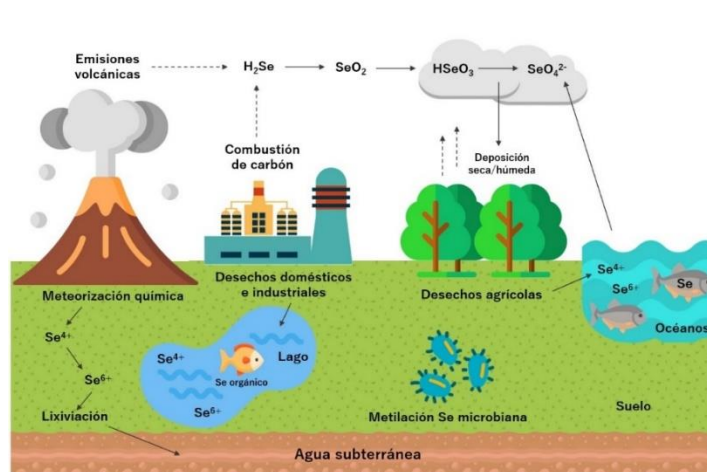


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del selenio

Las emisiones volcánicas y la extrusión de las rocas ígneas transportan el Se desde el centro de la tierra hasta la superficie. El contenido de Se proviene de las rocas, la industria y la agricultura y depende de su distribución geográfica. Generalmente, el Se total se

encuentra en rangos de entre 0.01 mg/kg a 2 mg/kg, pero en áreas ricas en Se natural puede llegar rondar los 37 mg/kg [4,5] Las especies de Se en suelos dependen del pH y las condiciones redox, pero predominan el selenato y selenito, especies más solubles en agua [6].

Los microorganismos tienen un papel crucial en la transformación del Se en el suelo. Algunos microorganismos como *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia fungorum* pueden reducir el selenito a Se elemental, y algunas bacterias y hongos metabolizan el Se, convirtiendo las especies inorgánicas en especies metiladas como dimetil selenio [7].

Las plantas absorben e incorporan el Se del suelo a través de las raíces y lo distribuyen al resto de tejidos. Por lo general, el contenido de Se es relativamente bajo (0.01-0.02 mg/kg peso seco), sin embargo existen plantas acumuladoras de Se que pueden alcanzar concentraciones de 1000-15000 mg/kg peso seco [8]. Las plantas pueden asimilar las formas inorgánicas de Se en selenocisteína (Sec) y selenometionina (SeMet) a través de transportadores de S y la ruta de asimilación del S, debido a la similitud de ambos elementos. La incorporación de estos selenoaminoácidos puede causar toxicidad, no obstante, las plantas han desarrollado mecanismos para prevenir su toxicidad, como la reducción de las especies inorgánicas a Se elemental insoluble o la metilación de los selenoaminoácidos a compuestos más volátiles. La acumulación de Se por parte de las plantas contribuye a la entrada del Se en la cadena alimenticia y al ciclo global de este elemento [9].

La presencia de Se en la atmósfera procede de las actividades naturales como la erosión del suelo, el vulcanismo y los incendios forestales, y de actividades humanas tales como la combustión de carbón e incineración de la basura. El contenido de Se es generalmente bajo, variando entre 1-10 ng·m⁻³, y se encuentra en forma de compuestos orgánicos volátiles (dimetil selenio, DMSe; dimetil diselenio DMDSe; metil selenol MeSeH), compuestos inorgánicos volátiles (dióxido de selenio, SeO₂, seleniuro de hidrógeno, H₂Se) y Se particulado. La atmósfera juega un papel muy importante en la dispersión, transporte y transformación del Se en el medioambiente [10,11].

En el agua (lagos, océanos) el Se proviene de los depósitos atmosféricos y el drenaje del suelo y subsuelos. En aguas naturales, las especies inorgánicas suelen ser las predominantes y las más móviles en el ciclo biogeoquímico. El Se(IV) es considerado más peligroso para los organismos acuáticos que el Se(VI) debido a su mayor solubilidad y biodisponibilidad. El ratio entre estas dos especies depende del pH, la presencia de agentes quelantes y los gases disueltos [12]. El límite máximo permitido en aguas de consumo establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO) es de 10 ppb, mientras que la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) fija este límite a 50 ppb [13,14].

1.1.2 Fuentes de selenio en la dieta

El Se es un elemento esencial necesario para el correcto funcionamiento de un organismo. La presencia de este elemento en el organismo humano depende tanto de la distribución geográfica como de la dieta [15]. Por lo general, los niveles de consumo de Se están en un rango muy estrecho: una ingesta de menos de 0.1 mg/kg resultará en una deficiencia de Se, mientras que un consumo superior a 1 mg/kg puede provocar manifestaciones tóxicas [16]. En adultos, la cantidad diaria recomendada (RDA) es de al menos 55 µg/día, lo que permite mantener una expresión máxima de la selenoproteína glutatión peroxidasa (GPx) [17]. Los productos de origen animal y vegetal son las principales fuentes de este elemento. Las plantas acumulan las formas inorgánicas de selenio para luego convertirlas en compuestos orgánicos, principalmente en selenometionina y selenocisteína [15]. En productos de origen animal, especialmente los de origen marino contienen unos altos valores de Se cuya forma predominante es la selenocisteína [18].

Las cantidades de Se en plantas y en los animales que las consumen dependen del contenido de Se en el suelo, y a su vez de otros factores como el tipo de suelo o cultivo, región geográfica, las condiciones climáticas y si el Se se encuentra en una forma asimilable para las plantas. Por tanto, la ingesta de Se en humanos es muy variable [15]. Las nueces de Brasil, los pescados y los órganos de las carnes son unas fuentes ricas en Se (Tabla 2).

La biodisponibilidad del Se depende de muchos factores, pero principalmente se le atribuye a su forma química. Por lo general, la absorción de todas las formas de Se es relativamente alta, siendo entre un 70-95%, pero varía según la fuente y el estatus de Se del individuo [19]. Las especies inorgánicas como el selenito y selenato son mejor absorbidas pero menos retenidas por el cuerpo que las formas orgánicas como la SeMet y Sec [20].

Alimento	Contenido Se (µg/ración)
Nueces de Brasil (6-8 ud)	544
Atún cocinado (3 onzas)	92
Fletán cocinado (3 onzas)	47
Sardinas (3 onzas)	45
Jamón asado (3 onzas)	42
Gambas enlatadas (3 onzas)	40
Macarrones cocinado (1 taza)	37
Filete de ternera (3 onzas)	33
Pavo (3 onzas)	31
Hígado de ternera (3 onzas)	28
Pollo (3 onzas)	22
Queso Cottage (1 taza)	20
Arroz integral grano largo (1 taza)	19
Ternera picada 25% grasa (3 onzas)	18
Huevo (1 ud)	15
Pan integral (1 rebanada)	13
Alubias (1 taza)	13
Harina de avena (1 taza)	13
Leche, 1% grasa (1 taza)	8
Yogurt, bajo en grasa (1 taza)	8
Lentejas (1 taza)	6
Pan blanco (1 rebanada)	6
Espinacas congeladas (1/2 taza)	5
Anacardos tostados (1 onza)	3
Copos de maíz (1 taza)	2
Guisantes congelados (1/2 taza)	1
Bananas (1/2 taza)	1
Patatas (1 ud)	1

Tabla 2. Contenido de selenio en alimentos seleccionados [21].

1.1.3 Suplementación de selenio

Debido a una deficiencia generalizada de selenio en humanos, a veces es necesaria la suplementación de este elemento. La suplementación de selenio se puede hacer de forma indirecta a través de la adición de Se a fertilizantes [22] y piensos utilizados en la alimentación animal [23] o de forma directa mediante el uso complementos alimenticios que contengan además vitaminas y micronutrientes [24].

- Uso de fertilizantes enriquecidos en selenio

Algunos países como Finlandia decidieron en 1984 suplementar las tierras de cultivo con selenito sódico para así poder alcanzar los RDA de selenio. Esta suplementación tiene dos efectos positivos, ya que aumenta el valor nutricional de Se en la cadena alimentaria (suelo-plantas-animales-humanos) y mejora el rendimiento de los cultivos agrícolas. Los niveles de selenio añadidos resultaron ser óptimos y no se observaron cantidades anormalmente altas en la cadena alimentaria, considerando esta técnica una forma eficaz y fácil de aumentar la ingesta de Se [25].

En China, se ha empleado la suplementación de Se para controlar las enfermedades provocadas por la deficiencia de Se (Keshan y Kashin-Beck) [26], mientras que en países como Japón, Australia o Estados Unidos se ha observado una mayor ingesta de Se debido al uso de fertilizantes suplementados [27–29].

- Animales suplementados en selenio

La suplementación para aumentar los niveles de Se en animales de granja se puede realizar mediante varias estrategias que incluyen: (1) la aplicación directa de Se a los pastos de plantas para la alimentación animal [30]; (2) suministro de selenito o selenato sódico en bloques de sal o lamedura [31]; (3) la administración directa de Se a los animales empapándolos con soluciones salinas de selenio [32]; y (4) el uso de piensos suplementados con Se [23].

- Suplementos alimenticios para humanos

En los últimos años, el mercado farmacéutico se ha visto sobrepasado con el uso de suplementos nutricionales basado en Se. Existen dos tipos: (1) suplementos multivitamínicos/multiminerales que contienen Se en forma de selenito o selenato de sodio, así como otros elementos traza y vitaminas [33], y (2) los suplementos basados en las levaduras enriquecidas en Se como la *Saccharomyces cerevisiae* [34]. También se ha estudiado el posible uso de las microalgas (*Chlorella sorkiniana*) como alimento funcional rico en selenio [35].

Los suplementos basados en levaduras enriquecidas en Se son la forma más atractiva de suplementación de Se ya que son la principal fuente de SeMet. La reacción del organismo frente a la suplementación de Se es más evidente cuando se emplean las formas orgánicas como la SeMet en comparación a las formas inorgánicas, ya que actúa como precursor en la síntesis de selenoproteínas [36]. Las ventajas adicionales del uso de levaduras enriquecidas en Se son su bajo coste y su fabricación sencilla. Además, tiene la posibilidad de emplear las levaduras enriquecidas en Se en lugar de las convencionales para la elaboración de productos de panadería [37].

1.2 Metabolismo del selenio en mamíferos

El Se posee un papel biológico crucial gracias a las selenoproteínas, sintetizadas en el sistema metabólico del Se. El metabolismo del Se (Figura 3) es un proceso sistémico que incluye la absorción, transporte, transformación y excreción [38].

La forma química del Se de partida determina su metabolismo. Las formas inorgánicas (selenito y selenato) entran en la ruta reductora y finalmente forman seleniuro reducido mediante los sistemas glutatión (GSH) y tioredoxina (TXN). El aminoácido selenometionina (SeMet) puede sustituir a la metionina en las proteínas o puede convertirse en selenocisteína (Sec), que posteriormente puede escindirse para formar seleniuro.

INTRODUCCIÓN

El selenio tiene dos potenciales rutas metabólicas, en una sufre una metilación secuencial y se excreta a través de la orina en forma de ion trimetil selenio. La segunda ruta resulta en la formación de las selenoproteínas. De manera mecánica, la selenofosfato sintetasa 2 (SEPHS2) cataliza la producción de selenofosfato a través de la reducción del seleniuro de hidrógeno. La reacción posterior con fosfoseril-tRNA (PSer-tRNA^[Ser]Sec) produce Sec-tRNA^[Ser]Sec. Los aminoácidos Sec se incorporan a las cadenas polipeptídicas a través de la maquinaria que utiliza el codón UGA. La proteína de unión a la secuencia de inserción de selenocisteína 2 (SBP2) se une al elemento de la secuencia de inserción de selenocisteína (SECIS) que se encuentra en la región no traducida 3' (3' UTR) del ARNm de selenoproteína y media la transferencia de Sec-tRNA^[Ser]Sec a el sitio A del ribosoma que reconoce el codón UGA como el codón de integración Sec. En conjunto, la maquinaria de traducción de la selenoproteína consta del elemento SECIS, SBP2, factor de elongación eucariota específico de Sec (EEFSEC) y Sec-tRNA^[Ser]Sec aminoacilado, lo que permite que UGA se reconozca como un codón Sec y se utilice para la traducción en un polipéptido [38,39].

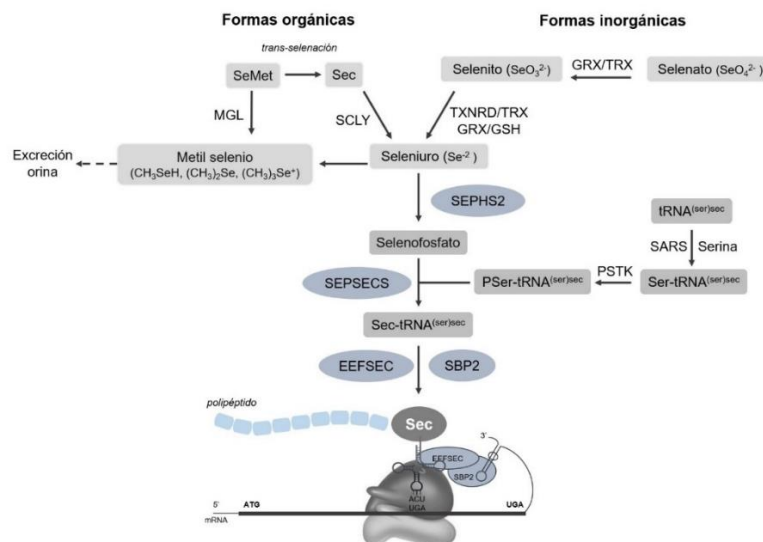


Figura 3. Metabolismo del selenio en mamíferos. Abreviaturas: SeMet, seleniometonina; Sec, selenocisteína; GRX, glutatión reductasa; TRX, Tiorredoxina; TXNRD, tiorredoxina reductasa; GSH, glutatión; MGL, metionina gamma-liasa; SCLY, selenocisteína liasa; SEPHS2, selenofosfato sintetasa 2; SARS, seril-tRNA sintetasa; PSTK, fosfoseril(Sep)-tRNA cinasa; SEPSECS, Sep-tRNA:Sec-tRNA sintasa; EEFSEC, factor de elongación eucariota específico de Sec; SBP2, proteína de unión a SECIS 2.

1.3 Selenoproteínas

Las proteínas que contienen selenio se clasifican en tres grupos. El primer grupo está compuesto por las denominadas selenoproteínas las cuales están en forma de selenocisteína (Sec) codificada genéticamente. En el segundo grupo, se encuentran las proteínas que contienen selenio incorporado no específicamente en el lugar de la metionina mediante el reemplazo del azufre; por tanto, en esta categoría está principalmente formada por proteínas ricas en metionina. El tercer grupo incluye las proteínas específicas en las cuales el selenio está simplemente enlazado a la molécula [40]. La esencialidad de este elemento en un organismo viene dada en gran parte por la presencia de las selenoproteínas, ya que están involucradas en la mayoría de las funciones biológicas.

En las selenoproteínas, el átomo de azufre (S) del selenoaminoácido Sec es reemplazado por Se [41]. La distribución de las selenoproteínas difiere entre los diferentes dominios de la vida (arqueas, bacterias y eucaria). En un principio se pensó que el reino vegetal y los hongos carecían de selenoproteínas, sin embargo, estudios de los últimos años han demostrado que existen algunas especies de microalgas como son las *Chlamydomonas* [42], *Ostreococcus* [43] y *Emiliania* [44] y hongos de los filo *Chytridiomycota*, *Zoopagomycota* y *Mucoromycota* [45] que poseen ciertas selenoproteínas, confirmando así que están presentes en todos los reinos de la vida. La mayoría de las especies del reino animal poseen selenoproteínas y su maquinaria de inserción de Sec. Hasta la fecha, los peces poseen el selenoproteoma más grande conocido con 29-41 selenoproteínas ya que han desarrollado una mayor dependencia del Se ambiental para el metabolismo redox [46,47]. En humanos se han identificado 25 genes de selenoproteínas y 24 en roedores [48].

En mamíferos, las selenoproteínas se clasifican en dos grandes grupos según la posición del residuo de Sec (Tabla 3). Un grupo lo comprenden las selenoproteínas con Sec cercano al C-terminal de la proteína y en el otro aquellas selenoproteínas con Sec en el segmento N-terminal de la proteína [49]. En el caso de la selenoproteína P, ésta no se incluye

en ninguna de las familias anteriores ya que posee tanto un residuo N-terminal como múltiples residuos en la región C-terminal [49].

Familia de selenoproteína	Posición Sec	Tamaño proteína
Sec en la región C-terminal		
Selenoproteína K	92	94
Selenoproteína S	188	189
Selenoproteína O	667	667
Selenoproteína I	387	397
Selenoproteína R (MsrB)	95	116
Tiorredoxina Reductasa (TR1)	498	499
Sec en la región N-terminal		
Yodotironina Desyodasa (DI1)	126	249
Selenoproteína H	38	116
Selenoproteína M	48	145
Selenoproteína N	428	556
Selenoproteína T	36	182
Selenoproteína V	273	346
Selenoproteína W	13	87
Selenofosfato Sintetasa (SPS2)	60	448
Glutación Peroxidasa (GPx1)	47	201
Selenoproteína 15 kDa	93	162

Tabla 3. Familias de selenoproteínas en mamíferos [49].

Las selenoproteínas efectúan numerosas funciones importantes en el organismo, como el mantenimiento celular, respuesta inmune, metabolismo de hormonas tiroideas y homeostasis del calcio entre otros, sin embargo, la función exacta de muchas de ellas aún no ha sido determinada. En la Tabla 4 se recoge una breve descripción de las funciones y localización de las selenoproteínas en humanos [50–52]. Respecto a las proteínas que contienen selenio, cabe destacar la selenoalbúmina (SeAlb). La SeAlb se forma en la sangre mediante el reemplazo inespecífico de la metionina con su seleno isologo. Su función es el transporte de Se hacia el hígado para la posterior síntesis de selenoproteínas [53]. Se emplea junto con la glutación peroxidasa y la selenoproteína P como marcadores del estatus de Se de un organismo [54].

INTRODUCCIÓN

Selenoproteína	Nombre gen	Sinónimo	Expresión	Localización subcelular	Función	Desórdenes asociados
Glutación peroxidasa 1	GPX1	Glutación peroxidasa 1	Mayoría tejidos	Citoplasma	Estrés oxidativo	Enfermedades cardiovasculares
Glutación peroxidasa 2	GPX2	Glutación peroxidasa 2	Número limitado de tejidos	Núcleo y citoplasma	Estrés oxidativo	Cáncer intestinal
Glutación peroxidasa 3	GPX3	Glutación peroxidasa 3	Mayoría tejidos	Excretada	Antioxidante	Protección cardiovascular
Glutación peroxidasa 4	GPX4	Glutación peroxidasa 4	Mayoría tejidos	Núcleo y mitocondria	Antioxidante y proteína estructural en esperma	Enfermedades inmunes, VIH
Glutación peroxidasa 6	GPX6	Glutación peroxidasa 6	Testículos, epidídimo, sistema olfativo	Excretada	Estrés oxidativo	desconocida
Tiorredoxina reductasa 1	TXNRD1	TR1, TRXR1	Ubicua	Núcleo y citoplasma	Reduce la forma oxidada de la tiorredoxina citosólica	Sobreexpresión en numerosos tipos de cáncer
Tiorredoxina reductasa 2	TXNRD2	TR2, TRXR2	Ubicua	Núcleo y citoplasma	Reduce la forma oxidada de la tiorredoxina mitocondrial y glutaredoxina 2	-
Tiorredoxina reductasa 3	TXNRD3	TR3, TRXR3	Mayoría tejidos, alta en testículos	Intracelular	Cataliza numerosas reacciones, específica de sistemas de tiorredoxina y glutaredoxina	-
Yodotironina desyodasa 1	DIO1	D1	Riñón, hígado, glándula tiroidea	Membrana intracelular	Elimina el I de la T4 para producir T3 en plasma. Cataliza la desyodinación e inactivación de T3	Disfunción tiroidea, enfermedad Kashin-Beck
Yodotironina desyodasa 2	DIO2	D2	Sistema nervioso central, pituitaria	Membrana intracelular	Convierte la T4 en T3 localizada en tejidos	Disfunción tiroidea, enfermedad Kashin-Beck
Yodotironina desyodasa 3	DIO3	D3	Algunos tejidos	Membrana intracelular	Cataliza la desyodinación de T4 a T3 en tejidos periféricos	Disfunción tiroidea, enfermedad Kashin-Beck

Tabla 4. Expresión, localización, función y desórdenes asociados de las 25 selenoproteínas en humanos. ER: retículo endoplasmático.

INTRODUCCIÓN

Selenoproteína	Nombre gen	Sinónimo	Expresión	Localización subcelular	Función	Desórdenes asociados
Selenoproteína F	SELENOF	Selenoproteína 15, Sel15, Sep15	Ubicua	ER	Componente de la degradación asociada al ER	-
Selenoproteína H	SELENOH	SelH	Ubicua	Núcleo	Protege las células de H ₂ O ₂ , aumenta la biogénesis mitocondrial y producción de CytC	-
Selenoproteína I	SELENOI	SelI	Ubicua	Transmembrana	desconocida	-
Selenoproteína K	SELENOK	SelK	Ubicua	ER, membrana plasmática	Componente de la degradación asociada al ER	-
Selenoproteína M	SELENOM	SelM	Ubicua	Nuclear y perinuclear	Protege las neuronas del estrés oxidativo	-
Selenoproteína N	SELENON	SelN	Ubicua	ER	Control del estado redox de los canales intracelulares de Ca ²⁺	Miopatía multicore, distrofia muscular
Selenoproteína O	SELENOO	SelO	Ubicua	Mitocondria	desconocida	-
Selenoproteína P	SELENOP	SelP, SEPP1, SEPP, SeP	Mayoría tejidos	Excretada, citoplasma	Transporte de Se y función antioxidante	Cáncer, enfermedades neurodegenerativas
Selenoproteína R	SELENOR	SelR, SelX, SEPX1	Ubicua	Citosol	Metionina sulfoxido reductasa, antioxidante	-
Selenoproteína S	SELENOS	SelS, SEPS1, VIMP	Ubicua	ER	Componente de la degradación asociada al ER	Respuesta inflamatoria
Selenoproteína T	SELENOT	SelT	Ubicua	ER	Regulación redox, adhesión celular	-
Selenoproteína V	SELENOV	SelV	Tiroides, paratiroides, testículos y cerebro	Intracelular	desconocida	-
Selenoproteína W	SELENOW	SelW	Ubicua	Intracelular	desconocida	-
Selenofosfato sintetasa 2	SEPHS2	SPS2	Ubicua, alta en hígado y riñón	Intracelular	Síntesis de selenofosfato	Disfunción tiroidea

Tabla 4 (continuación). Expresión, localización, función y desórdenes asociados de las 25 selenoproteínas en humanos. ER: retículo endoplasmático.

1.3.1 Técnicas analíticas para la cuantificación de selenoproteínas

La expresión de las selenoproteínas depende de los niveles de Se provenientes de la dieta y de las condiciones fisiopatológicas. La información sobre el Se total presente en un organismo es de gran importancia para evaluar su abundancia o deficiencia, pero también la distribución entre las selenoproteínas o proteínas que contengan selenio es fundamental para obtener una evaluación precisa [55–58]. Por ello, se han desarrollado varias metodologías analíticas que permiten la cuantificación de selenoproteínas.

- Inmunoensayos

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un método basado en el reconocimiento selectivo y específico anticuerpo-antígeno. En este método, una enzima se une covalentemente a un anticuerpo específico que reconoce a un antígeno diana. Si el antígeno está presente, el complejo enzima-anticuerpo se unirá a él y el componente enzimático del complejo catalizará la reacción que generará un producto coloreado. Existen cuatro tipos de ensayos ELISA: directo, indirecto, sándwich y competitivo [59].

- **Directo:** el antígeno o muestra es inmovilizado directamente sobre la superficie y se conjuga con el anticuerpo que está unido a la proteína de interés.
- **Indirecto:** similar al ensayo directo, pero se incluye una etapa de amplificación. Primero se agrega un anticuerpo de detección primario no conjugado y se une al antígeno específico. Luego se agrega un anticuerpo secundario conjugado dirigido contra la especie huésped del anticuerpo primario.
- **Sándwich:** es el ensayo más común y posee una alta especificidad. Se utilizan dos anticuerpos específicos para intercalar el antígeno, comúnmente denominados pares de anticuerpos compatibles. El anticuerpo de captura se recubre en una microplaca, se agrega la muestra y la proteína de interés se une y se inmoviliza en la placa. Luego se agrega un anticuerpo de detección conjugado y se une a un epítipo adicional en la proteína objetivo.

- **Competitivo:** Los ELISA competitivos se usan comúnmente para moléculas pequeñas, cuando la proteína de interés es demasiado pequeña para intercalarse de manera eficiente con dos anticuerpos. Similar a un ELISA de sándwich, un anticuerpo de captura se recubre en una microplaca. En lugar de usar un anticuerpo de detección conjugado, se usa un antígeno conjugado para completar la unión con el antígeno presente en la muestra. Cuanto más antígeno presente en la muestra, menos antígeno conjugado se unirá al anticuerpo de captura.

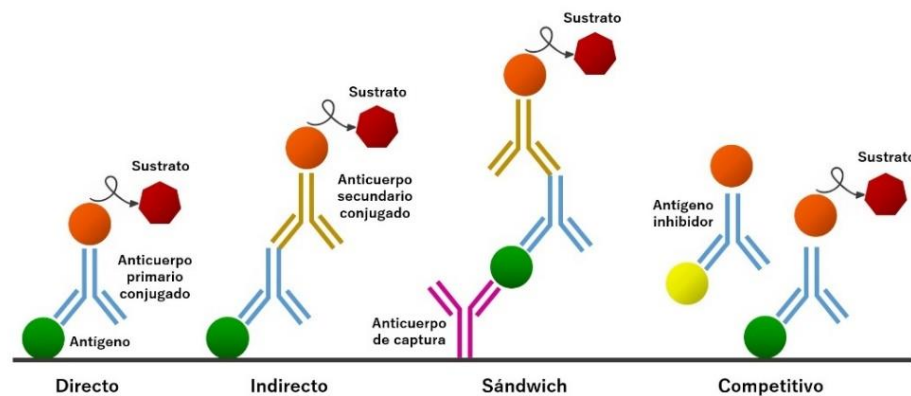


Figura 4. Tipos de ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Este ensayo se desarrolló en el año 2007, para la cuantificación de SELENOS en muestras de suero sanguíneo [60], ganando popularidad a lo largo de los años sobre todo para la cuantificación de SELENOP y GPX1 [61,62]. Actualmente se han desarrollado numerosos kits comerciales para la cuantificación de SELENOP [63,64]. La precisión de los resultados depende del epítipo identificado por el anticuerpo y su selectividad. En el caso de la SELENOP, si un anticuerpo reconoce solo, por ejemplo el N-terminal, los ensayos capturarán no solo la SELENOP completa, sino también el fragmento SELENOP-N-terminal. Para determinar la SELENOP completa en suero humano se ha desarrollado un método que emplea partículas de oro coloidal recubiertas con dos tipos de anticuerpos que reconocen tanto el dominio N-terminal como el C-terminal [65].

- Electroforesis en gel

Las dos técnicas basadas en la electroforesis en gel para la separación de selenoproteínas son el isoelectroenfoque (IEF) y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

- **Isoelectroenfoque (IEF):** En la técnica de IEF las proteínas se separan en base a su punto isoeléctrico (pI). El pI es el valor de pH en el cual una proteína no tiene carga neta y por tanto no se mueve a través de un campo eléctrico. En un gel se establece un gradiente de pH, al cargar la muestra y aplicar un voltaje las proteínas emigrarán a su pH isoeléctrico formando una banda visible. Este método permite distinguir proteínas que difieren tan solo de 0.01 de pI [59]. Como se puede observar en la tabla X, las selenoproteínas humanas se pueden separar en función de su pI, ya que varían en un rango de 4.96-10.54 [66,67].
- **Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE):** permite separar las selenoproteínas según su peso molecular. Las cadenas polipeptídicas forman un complejo con las moléculas cargadas negativamente de dodecilsulfato sódico (SDS). Cuando se aplica un campo eléctrico migran como un complejo SDS-proteína a través de un gel poroso de poliacrilamida en una dirección y con una velocidad que refleja su tamaño y carga neta [68]. La selenoproteína P tiene una masa molecular de 43 kDa, pero puede migrar como bandas múltiples de aproximadamente 50-60 kDa, probablemente debido a las variaciones en la glicosilación. La desglicosilación puede desplazar la banda hasta su valor de 43 kDa. También se ha observado una movilidad a 69 kDa en condiciones no reductoras y a 66 kDa en condiciones reductoras [69].

En la Tabla 5 se recogen el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (Da) de las 25 selenoproteínas humanas.

Selenoproteína	pI	Peso molecular (Da)
Glutación peroxidasa 1	6.15	21.899
Glutación peroxidasa 2	7.6	21.907
Glutación peroxidasa 3	8.2	25.505
Glutación peroxidasa 4	8.64	22.128
Glutación peroxidasa 6	6.21	24.924
Tiorredoxina reductasa 1	6.07	54.707
Tiorredoxina reductasa 2	6.36	56.46
Tiorredoxina reductasa 3	7.23	63.54
Yodotironina desyodasa 1	8.81	28.878
Yodotironina desyodasa 2	6.6	29.6
Yodotironina desyodasa 3	6.24	31.404
Selenoproteína F	4.96	17.744
Selenoproteína H	9.65	13.407
Selenoproteína I	6.12	45.182
Selenoproteína K	10.54	10.598
Selenoproteína M	5.39	16.185
Selenoproteína N	5.38	65.793
Selenoproteína O	5.69	73.442
Selenoproteína P	7.92	42.705
Selenoproteína R	8.57	12.713
Selenoproteína S	9.65	21.116
Selenoproteína T	8.69	22.277
Selenoproteína V	9.57	36.754
Selenoproteína W	9.2	9270
Selenofosfato sintetasa 2	5.63	47.305

Tabla 5. Punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (Da) de las selenoproteínas en humanos.

Para la posterior detección de las selenoproteínas se emplean diferentes aproximaciones:

- **Ablación láser-ICP-MS (LA-ICP-MS):** es la técnica por excelencia para el análisis de metales traza en muestras sólidas. Un rayo láser a una determinada longitud de onda es dirigido a la superficie de una muestra generando y liberando partículas de muestra y resultando en un aerosol que es transportado al sistema de detección ICP-MS [70]. Este método ha sido aplicado principalmente para la

detección de selenoproteínas en diferentes líneas celulares de riñón (HEK293), próstata (LNCaP), piel (HaCaT), hígado (HepG2) ofreciendo mejores rangos dinámicos, superando a las técnicas de Western blot y ELISA [66,67].

- **Western Blot:** las proteínas separadas previamente mediante electroforesis en gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF). A continuación, se bloquea la membrana para evitar cualquier unión no específica de anticuerpos a la superficie de la membrana. La proteína transferida se incuba con una combinación de anticuerpos: un anticuerpo específico para la proteína de interés (anticuerpo primario) y otro anticuerpo específico para la especie huésped del anticuerpo primario (anticuerpo secundario). A menudo, el anticuerpo secundario forma un complejo con una enzima que, cuando se combina con un sustrato adecuado, produce una señal detectable [71]. Esta técnica se ha empleado para detección de diferentes selenoproteínas en diversas matrices biológicas como tejidos de cerdo [72,73], pollo [74] o ratón [75,76] y líneas celulares [77]. La selectividad del método depende en menor medida de la calidad de los anticuerpos en comparación con el ELISA, y se ofrece un paso de separación adicional en el SDS-PAGE. Este método no tiene en cuenta las pérdidas en los diferentes pasos del procedimiento, pero éstos pueden ser compensadas por la calibración con un material de referencia estándar [69].
- **Trazador ^{75}Se :** el uso de un radioisótopo es una herramienta muy útil para la detección de selenoproteínas tanto en modelos animales como cultivos celulares. El uso es similar al del ^{35}S , con la diferencia significativa que el ^{75}Se se incorpora en las proteínas usando el selenito, mientras que el ^{35}S lo hace en forma de ^{35}S -metionina o ^{35}S -cisteína. Una vez separadas las selenoproteínas radiomarcadas mediante IEF o SDS-PAGE, éstas son reveladas mediante un contador gamma o autoradiografía. Esta técnica está limitada a laboratorios específicos que

manejen gamma-radioactividad. También puede emplearse para el estudio del metabolismo del Se y la maquinaria de inserción de Sec [78–80].

- Etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ)

La técnica iTRAQ (*Isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantification*) emplea reactivos isobáricos para marcar las aminas primarias de péptidos y proteínas (Figura 5). Estos reactivos constan de un grupo indicador de N-metil piperazina, un grupo de equilibrio y un grupo éster de N-hidroxisuccinimida que reacciona con las aminas primarias de los péptidos. Los grupos de equilibrio presentes en cada uno de los reactivos iTRAQ funcionan para hacer que los péptidos marcados de cada muestra sean isobáricos y la cuantificación se facilita a través del análisis de los grupos indicadores que se generan tras la fragmentación en el espectrómetro de masas. Luego, estas muestras se agrupan y, por lo general, analizadas mediante cromatografía líquida (LC) espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [81,82].

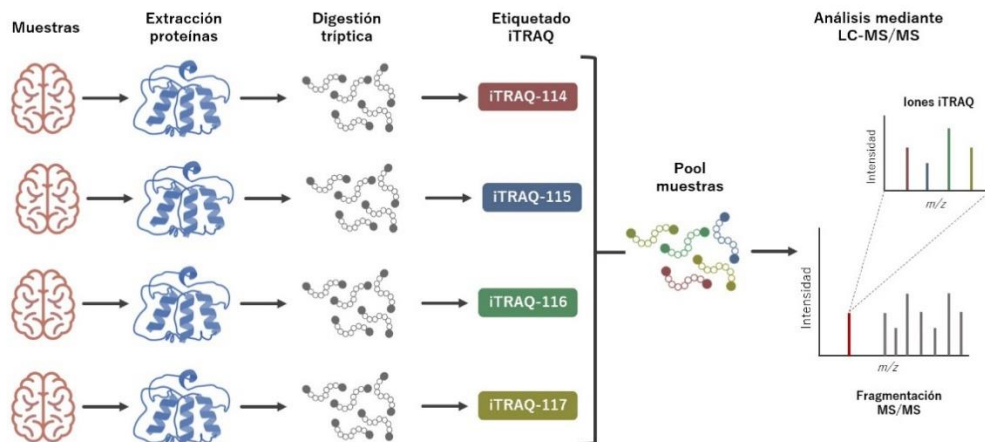


Figura 5. Etapas de un análisis mediante la técnica de etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).

La búsqueda en bases de datos usando los datos de fragmentación permite la identificación de los péptidos etiquetados, y por tanto de la proteína correspondiente. Esta técnica de aproximación proteómica se ha empleado en el estudio de diferentes

enfermedades, pudiendo cuantificar como biomarcadores la selenoproteína U [83], selenoproteína P [82,84,85] y selenoproteína F [86].

- Cromatografía líquida- espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (LC-ICP-MS)

La especiación de selenoproteínas mediante LC-ICP-MS permite la separación y cuantificación de GPx, selenoproteína P, selenometabolitos y SeAlb. El principio de este método se basa en la disposición en línea de diferentes configuraciones de columnas cromatográficas: exclusión por tamaño para la separación según la masa molecular, heparina para la retención selectiva de SELENOP, y una columna Blue-Sepharose para la retención selectiva de SeAlb. La configuración de las columnas empleada en esta Tesis Doctoral se detalla en el apartado Experimental 3.7. La detección y cuantificación de estas especies se describe en el apartado Introducción 2.1

La cuantificación de las especies se realiza mediante el análisis de dilución isotópica (IDA). Esta técnica está basada en la medición de proporciones de isótopos en muestras en las que su composición isotópica se ha alterado mediante la adición de una cantidad conocida de un elemento enriquecido isotópicamente (spike). El elemento a analizar debe tener, por lo tanto, al menos dos isótopos radiactivos estables o de vida larga que puedan ser medidos en un espectrómetro de masas libre de interferencias espectrales [87]. La figura 6 ilustra este principio.

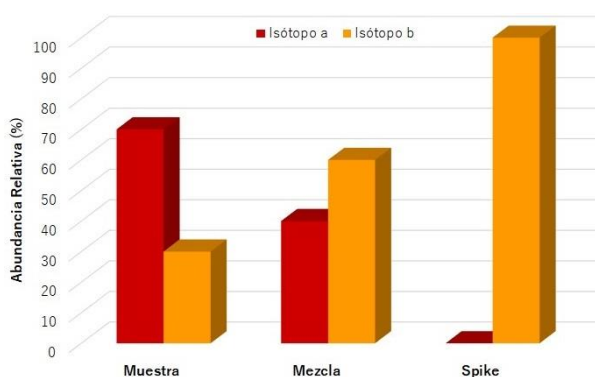


Figura 6. Ilustración del principio del análisis de dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos diferentes (a y b).

Como se puede observar, el isótopo 'a' es el más abundante en la muestra mientras que el spike está isotópicamente enriquecida en el isótopo 'b'. La abundancia de los dos isótopos es conocida y, por tanto, la relación isotópica en la mezcla será intermedia entre la de la muestra y la del spike y dependerá tanto de la cantidad de spike añadido como de la cantidad inicial del elemento en la muestra.

La ecuación de la dilución isotópica que permite cuantificar la concentración de un elemento en una muestra puede expresarse de diferentes formas, pero la más empleada es la siguiente:

$$c_s = c_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \frac{A_{sp}}{A_s} \cdot \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s} \right)$$

Donde:

- c_s y c_{sp} son las concentraciones del elemento en la muestra y el spike respectivamente.
- m_s y m_{sp} son la masa tomada de la muestra y el spike.
- M_s y M_{sp} son los pesos atómicos del elemento en la muestra y el spike.
- A_s y A_{sp} son la relación de la abundancia natural en la muestra y el spike.
- R_s , R_{sp} y R_m son la relación entre los isótopos 'a' y 'b', siendo 'b' el isótopo minoritario en la muestra, spike y la mezcla respectivamente.

En esta ecuación, la concentración del elemento en la muestra (c_s) se determina simplemente midiendo el parámetro R_m mediante espectrometría de masas, ya que se conocen todos los demás parámetros de la ecuación.

Dependiendo de cuándo y en qué forma química se agregue el spike a la muestra, la aplicación de la IDA se puede realizar de dos modos diferentes, denominados los llamados "específicos de la especie" y "no-específicos de la especie".

- **Modo de especies no-específicas (SUID):** la adición del trazador de isótopos o adición se lleva a cabo después de que se haya producido la separación completa de las

especies naturales en la muestra (adición posterior a la columna). Este modo suele emplearse cuando la estructura y composición de la especie buscada no se conoce exactamente, o cuando los compuestos marcados isotópicamente no están disponibles comercialmente o no pueden sintetizarse. El modo SUID para el análisis de las selenoproteínas se realiza mediante la adición de Se^{77} o Se^{74} en forma de SeMet o selenito como spike [87–90].

- **Modo de especies específicas (SSID):** En este modo, la solución spike se agrega a la muestra al comienzo del procedimiento analítico, por lo que se requiere del uso de una solución de spike que contenga la especie a analizar marcada isotópicamente. A diferencia del modo no-específico de especie, la composición y estructura de la especie de interés debe conocerse exactamente para así sintetizar la especie enriquecida correspondiente o adquirir la solución de adición adecuada si está disponible comercialmente. El modo SSID se ha empleado también para la cuantificación de selenoproteínas [91,92].

- Expresión génica

La PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) es un desarrollo importante de la tecnología de PCR que permite la detección y medición confiables de los productos generados durante cada ciclo del proceso de PCR. Esta técnica se hizo posible después de la introducción de una sonda de oligonucleótidos que se diseñó para hibridarse dentro de la secuencia diana. La escisión de la sonda durante la PCR debido a la actividad nucleasa 5' de la polimerasa Taq se puede utilizar para detectar la amplificación del producto específico de la diana [93]. Esta técnica permite analizar la expresión de todas las selenoproteínas presentes en cualquier tejido [94–97].

A continuación, se recogen las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas para la cuantificación de selenoproteínas anteriormente descritas:

Técnica	Pros	Contras
ELISA	Especificidad media Alta sensibilidad Alta cuantificación Baja variabilidad Posibilidad automatización Buena reproducibilidad	Falsos positivos Alto consumo muestra Alto uso reactivos Configuración costosa para automatización Alto consumo tiempo
LA-ICP-MS	Fácil uso Alta sensibilidad Alto rango dinámico Adquisición simultánea Bajo consumo muestra	Mantener integridad del heteroátomo en el gel Necesidad de mineralización del gel para control de hidratación
Western Blot	Alta especificidad Alta sensibilidad	Alto consumo tiempo Desnaturalización proteínas Cuantificación media Bajo-medio rendimiento Alto consumo muestra
Trazador ^{75}Se	Comparación sencilla con un estándar	Necesidad de manipular radiactividad gamma El Se presente tiene que estar en forma radioactiva No es una opción para SELENOP humana
iTRAQ	Alta cuantificación Capacidad de multiplexación Tiempo de análisis reducido	Reactivos costosos y sensibles a contaminación Requiere software sofisticado para datos Variabilidad debido a la digestión enzimática
LC-ICP-MS	Detección individual isótopos de Se Cuantificación mediante dilución isotópica Alta sensibilidad Alta reproducibilidad	Interferencias poliatómicas por Br o S Sólo aplicable a GPx, SELENO y SeAlb
Expresión génica	Análisis cualitativo y cuantitativo Requiere poca cantidad de muestra Simple, fácil manejo y rápido Alta especificidad y sensibilidad	Extremadamente sensible a contaminación Sólo genes genéticamente codificados

Tabla 6. Comparación de las técnicas para la cuantificación de selenoproteínas.

1.4 Importancia biológica del selenio

Desde su descubrimiento, el Se ha sido considerado un elemento tóxico para la vida con potenciales efectos nocivos para el ser humano. En la década de 1930 en las Grandes Llanuras de los Estados Unidos, se descubrió que el Se era acumulado y concentrado en el suelo por algunas plantas, tanto en sus formas inorgánicas como orgánicas. Estas concentraciones que excedían de 1g Se/kg peso seco, podían provocar toxicidad al ganado de pastoreo, afectado al sistema nervioso y el crecimiento de los tejidos [98]. No fue hasta finales de los años 60, cuando Schwarz et al. (1959) demostraron que la suplementación a bajas concentraciones de Se podían prevenir la necrosis del hígado en ratas [99] arrojando una nueva luz y llevando al reconocimiento del selenio como un micronutriente esencial. Más tarde, en 1973, se descubrió que el Se formaba el centro activo de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), cuyo papel principal es la protección contra el estrés oxidativo [100]. Desde entonces, las investigaciones científicas se han centrado en las consecuencias de deficiencia de Se así como en los beneficios de este elemento en la salud.

El Se es un elemento traza esencial en mamíferos y puede estar presente en especies orgánicas como selenoaminoácidos selenocisteína (Sec) o selenometionina (SeMet)) y especies inorgánicas (SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-}) (Figura 7). Tanto los efectos beneficiosos como tóxicos del Se sugieren que el mecanismo de acción del Se esta estrictamente relacionado con su forma química y su concentración. La principal fuente de Se en humanos es a través de la dieta o suplementos nutricionales. La mayoría del Se ingerido se emplea para la síntesis de selenoenzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) o la tiorredoxina reductasa (TrxR), las cuales están involucradas en numerosos procesos metabólicos [101].

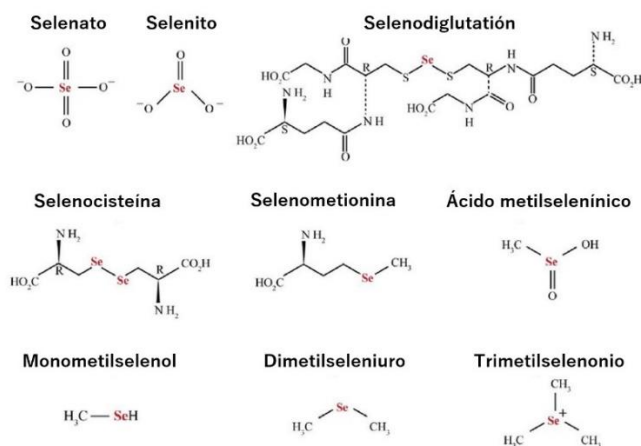


Figura 7. Especies de Se más relevantes desde un punto de vista biológico.

Tanto los efectos beneficiosos como tóxicos del Se sugieren que el mecanismo de acción del Se está estrictamente relacionado con su forma química y su concentración. Entre los numerosos efectos beneficiosos para la salud en los que está implicado el Se o sus especies podemos encontrar:

- **Enfermedades cardiovasculares (CVD)**

Estudios de caso-control han demostrado que los niveles de Se en sangre de pacientes con CVD eran menores que en sujetos sanos, sugiriendo una correlación entre los niveles de Se y el riesgo de padecer una CVD [102–106].

- **Cáncer**

El Se se emplea en aplicaciones clínicas como fármaco anticancerígeno debido a su implicación en importantes procesos redox fisiológicos o como agente quelante. También estimula la respuesta inmune y detoxifica los metabolitos intermediarios de la carcinogénesis [107–109].

- **Diabetes**

Gracias a las propiedades antioxidantes del Se, existen numerosos estudios sobre su papel en la diabetes. Selenoproteínas como la glutatión peroxidasa 1 están involucradas en la síntesis, secreción y señalización de insulina, mientras que la selenoproteína P posee el

efecto de contrarrestar la señalización de insulina. Las yodotironina desyodasa catalizan el metabolismo de las hormonas tiroideas afectando al metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas en el estado diabético. En la etiología de la diabetes también están implicadas la selenoproteína S, M y T y GPX3[110–112].

- **Procesos inflamatorios y respuesta inmune**

De nuevo, y a consecuencia de los efectos antioxidantes del Se, éste se presenta como estrategia terapéutica para disminuir la actividad inflamatoria en enfermedades, manteniendo los niveles de ROS bajo control [113,114]. Recientemente, se ha demostrado un vínculo potencial entre la disminución de selenoproteínas involucradas en el control del estrés del RE y la inflamación asociada por COVID-19 [115], así como una disminución gradual de los niveles de Se en suero en pacientes con esta enfermedad [116].

La asociación entre el estatus de Se y el riesgo de enfermedades tiene un comportamiento en U: tanto una ingesta insuficiente como la excesiva de este elemento puede ocasionar efectos adversos para la salud humana (Figura 8) [117], siendo la cantidad diaria recomendada de este elemento de 55 µg/día [118].

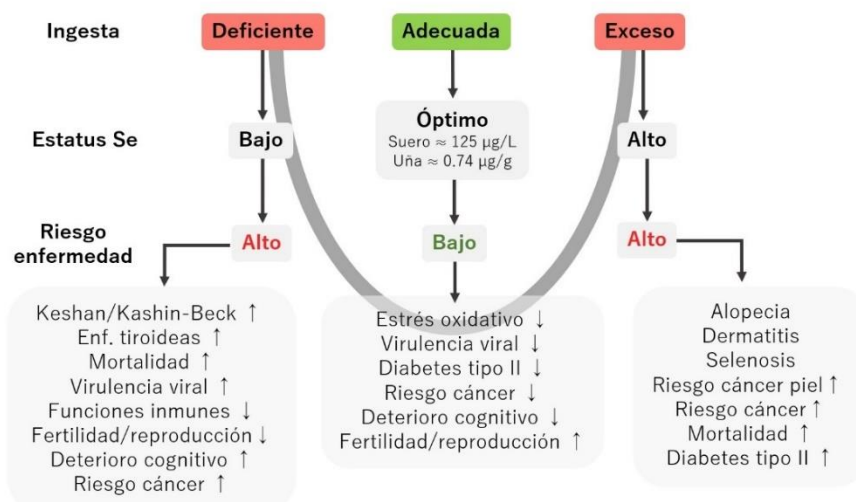


Figura 8. Comportamiento en U entre el estatus de Se y el riesgo de enfermedades [119].

1.4.1 Deficiencia de selenio

Una deficiencia de Se en el organismo puede originar una mala incorporación de la Se en las diferentes selenoproteínas. Esto resulta en un desorden complejo y multifactorial que se refleja en una pérdida de la funcionalidad de las selenoproteínas y por ende en su implicación biológica en el sistema inmune, regulación hormonal o funcionamiento del CNS entre otros. Aunque las carencias de Se son poco comunes, se pueden ocasionar dos enfermedades como la enfermedad de Keshan y la de Kashin-Beck.

- **Enfermedad de Keshan**

En 1979 se reportó por primera vez la enfermedad de Keshan, una cardiomiopatía que aparece generalmente en niños y mujeres en edad reproductiva en áreas con bajas concentraciones de yodo (I) y Se en suelos y alimentos. La principal patología de esta enfermedad es la necrosis multifocal del miocardio que causa un agrandamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca, choque cardiogénico y la muerte [120].

- **Enfermedad de Kashin-Beck**

La enfermedad de Kashin-Beck es una osteoartritis endémica crónica que ocurre generalmente en adolescentes debido a una necrosis de los cartílagos. Esta enfermedad se caracteriza porque los que la padecen poseen una baja estatura, deformidad y dolor de articulaciones. Epidemiológicamente es una enfermedad que se distribuye principalmente en partes del Tíbet, China, Siberia y Corea del Norte [121].

1.4.2 Toxicidad y exceso de selenio

A pesar de que el Se es un elemento esencial en mamíferos, como ocurre con otros elementos traza puede resultar tóxico a elevadas concentraciones. Los efectos tóxicos del Se dependen de varios factores como la forma química en la que se encuentre, su concentración y las transformaciones que pueda llegar a sufrir en el medioambiente. El Se inorgánico y sus formas aminoácidos son fácilmente accesibles y más tóxicas que las formas metiladas como

el cloruro de trimetilselenonio y dimetilselenuro, que llegan a ser de 10 a 1000 veces menos tóxicas, respectivamente [122,123].

La toxicidad medioambiental del Se en humanos es poco frecuente, sin embargo una ingesta en exceso de alimentos o suplementos con alto contenido en Se (selenosis) pueden causar desórdenes gastrointestinales, cambios en el pelo y uñas y manifestaciones neurológicas [118,124].

1.4.3 Selenio, fertilidad y salud reproductiva

La capacidad reproductiva óptima depende de numerosas variables, como los genes, factores externos y la dieta entre otros. Las pequeñas diferencias en los niveles de micronutrientes esenciales pueden afectar drásticamente los procesos fisiológicos, entre ellos, la fertilidad [125]. Existen numerosos estudios que muestran la conexión entre el estatus de Se y las funciones reproductivas en hombres [126,127] y mujeres [128,129].

La información acerca de la importancia del Se en la fertilidad femenina es aún escasa. Los estudios recientes en reproducción femenina han revelado que los niveles de Se son más altos en los folículos de los ovarios sanos, sugiriendo que el Se puede desempeñar un papel antioxidante durante el crecimiento y la proliferación folicular [130]. Las hormonas tiroideas también son esenciales para una óptima reproducción en mamíferos y su metabolismo está influenciado por las selenoproteínas tioredoxinas y desyodasas. La deficiencia de Se puede reducir los niveles de estas selenoproteínas, alterando la función placentaria y el desarrollo fetal [131,132].

El papel del Se en la reproducción masculina está bien establecido y determinadas selenoproteínas juegan un papel clave en la respuesta redox involucrada en la reproducción masculina. Es sabido que el Se influye en la morfología macroscópica e histológica de los testículos. En ratones con deficiencia de Se se observó que el diámetro de los túbulos seminíferos y la actividad espermatogénica estaban reducidos [133]. La suplementación de Se en cabras y toros y provocó un aumento de la secreción de la testosterona, una mayor

concentración de Se en testículos y vesículas seminales, así como una maduración sexual más temprana [134,135].

Asri-Rezaei et al. concluyeron que la concentración de Se en testículos de ratones macho aumentaba significativamente después de inyecciones intraperitoneales de selenito de sodio y nanopartículas de Se. Del mismo modo, las actividades enzimáticas de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) también aumentaron sustancialmente mientras disminuía el nivel de malondialdehído (MDA) después de la suplementación con Se [136]. Para el funcionamiento óptimo de los espermatozoides, es importante establecer un equilibrio de Se en el cuerpo en el control redox de la reproducción masculina. En un estudio en ratones se observó un aumento sustancial en los niveles de marcadores relacionados con el estrés oxidativo (MDA y ROS) en ratones con dietas tanto con deficiencia como con exceso de Se [137].

Respecto a la influencia de las selenoproteínas en la reproducción masculina cabe destacar la expresión de la glutatión peroxidasa 1,3 y 4 (GPx) y la selenoproteína P. Se supone que la GPx4 protege a los espermatozoides del daño en el ADN causado por el estrés oxidativo en las fases iniciales de la espermatogénesis, además, en etapas posteriores de la espermatogénesis proporciona estabilidad a la mitad de los espermatozoides al ser parte de la estructura mitocondrial que rodea el flagelo, un elemento importante para proporcionar integridad y motilidad a los espermatozoides [138–140]. En toros se ha observado una fuerte expresión de GPX4 en los túbulos seminíferos durante las diferentes etapas de la espermatogénesis, demostrando que la GPX4 es crucial para la producción y funcionamiento del esperma [141].

La SELENOP actúa como proteína transportadora de Se y está presente en las estructuras vesiculares en la región basal de las células de Sertoli [142]. Las células de Sertoli son esenciales en el proceso de espermatogénesis, ya que no solo brindan función de anclaje sino también nutrición y regulación endocrina de la espermatogénesis en los espermatozoides en desarrollo [143]. Los ratones macho con *knockout* para la SELENOP

mostran una reducción considerable en la fertilidad, niveles más bajos de Se y disminución de la actividad de GPx. La suplementación a altos niveles de Se en la dieta alta no logró restaurar los niveles de Se testicular o el fenotipo normal de los espermatozoides en estos ratones, reiterando nuevamente la importancia del Se en la espermatogénesis [144]. Estos cambios sugieren que los niveles óptimos de SELENOP son primordiales en las funciones y la fertilidad de los espermatozoides.

Las selenoproteínas GPx1 y GPx3 son menos abundantes que las anteriores, pero están presentes en los tejidos y las secreciones involucradas en la reproducción masculina. Estas selenoproteínas están expresadas y definidas en los espermatozoides y las células epiteliales del epidídimo. En algunos estudios, el parénquima del epidídimo y los espermatozoides en maduración están protegidos frente al estrés oxidativo por estas dos selenoproteínas. Además, GPX3 se mueve a través del lumen del epidídimo con los espermatozoides para defenderse de las ROS durante el proceso de maduración [145].

La selenoproteína V sólo se expresa en testículos, sin embargo sus funciones aún no son conocidas. En un estudio en ratones se ha encontrado que posee actividad como la Tiorredoxina reductasa y la glutatión peroxidasa, indicando que toma parte en los procesos redox de las células. Los niveles de expresión de la SELENOP son máximos durante la pubertad, mientras que de adultos se observa una disminución gradual [146].

1.4.4 Selenio, neurodesarrollo y enfermedades neurológicas

De entre todos los órganos, el cerebro es el órgano que prioriza la retención de Se en condiciones de deficiencia, siendo de vital importancia en el mantenimiento de las funciones fisiológicas del sistema nervioso central (CNS) [147]. Se han observado cambios en los niveles de Se en el cerebro, sangre y fluido cerebroespinal de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer [148], Parkinson [149], esclerosis múltiple [150] y otros desórdenes neurológicos [151].

Como se comentaba anteriormente, la importancia biológica y la esencialidad del Se radica en las selenoproteínas. Los niveles de expresión diferencial de las selenoproteínas en tejidos y órganos están directamente relacionados con sus funciones biológicas. La mayoría de las selenoproteínas se expresan en el cerebro, principalmente en las neuronas, y en todas las regiones cerebrales [47]. Fagerberg et al. [152] ha clasificado los niveles de expresión de las 25 selenoproteínas en el cerebro humano (Figura 9).

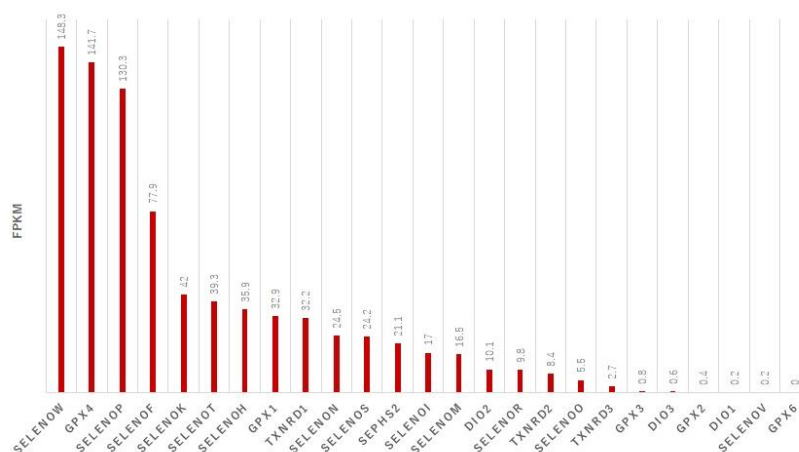


Figura 9. Clasificación de los niveles de expresión mRNA de las 25 selenoproteínas en cerebro humano. FPKM: fragmentos por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas mapeadas. Gráfico realizado con datos obtenidos de la literatura [151].

Los mayores niveles de expresión se observan para las selenoproteínas SELENOW, GPx4, SELENOP, SELENOF y SELENOK en más del 90% de las regiones del cerebro, mientras que las selenoproteínas GPx3, DIO3, GPx2, DIO1, SELENOV, y GPx6 poseen una muy baja o nula expresión en el cerebro humano [152]. Este patrón de expresión es muy similar al observado en el cerebro de ratón [48].

Algunas selenoproteínas son esenciales para el desarrollo y funcionamiento del cerebro, en particular la glutatión peroxidasa 4 (GPx4), pero también la Tiorredoxina reductasa 1 (TXNRD1) y la selenoproteína T (SELENOT) [153]. Actualmente la función de GPx4 es de importante regulador de la ferroptosis en el desarrollo y enfermedades [154,155]. Aún no está del todo claro si la GPx4 es una proteína indispensable para las neuronas y si hay una relación casual con desórdenes neurológicos.

La SELENOT es una selenoproteína residente en el RE. Los ratones *knockout* para la SELENOT tiene una disminución significativa de los volúmenes hipocámpal, cortical y cerebeloso debido a la apoptosis neuronal en el cerebro de ratones recién nacidos, lo que lleva a una función cerebral anormal en adultos. Estos resultados sugieren una función neuroprotectora de la SELENOT [153]. Además, los resultados de Boukhzar et al. han confirmado que la SELENOT es necesaria para la producción de dopamina [156].

Las funciones biológicas de la selenoproteína más expresada en el cerebro, la SELENOW, no están del todo claras. Los estudios preliminares apuntan a un papel protector de las neuronas contra el daño por estrés oxidativo, ya que los niveles de apoptosis celular inducida por H_2O_2 en ratones *knockout* para la SELENOW se vieron significativamente aumentados [157].

El Se penetra en el cerebro tanto en formas no fisiológicas como sales de selenito o fisiológicamente en forma de SELENOP, sintetizada en el hígado y transportada a través de la barrera hematoencefálica (BHE) [158]. La SELENOP también se expresa en el cerebro y contribuye al almacenamiento y reciclaje de Se [159,160]. La SELENOP fue la primera selenoproteína identificada asociada con la transmisión de señales sinápticas [161] y se cree que participa en los procesos de transducción de neuronas GABAérgicas junto con la GPx4 [162].

Respecto a la SELENOK, el estudio de Zhang et al. ha mostrado un desajuste en los niveles de los receptores de glutamato durante la transmisión de señales sinápticas en ratones con *knockout* para esta selenoproteína, sugiriendo su posible papel en las transmisiones neuronales [148].

Estudios recientes de SELENOI han mostrado que la mutación en la EPT1 (etanolamina fosfotransferasa 1) conduce a una atrofia del cerebelo y tronco encefálico, que puede inducir a sordera y ceguera [163].

En ratones *knockout* para la TXNRD1 se ha visto una hipoplasia cerebelosa indicando que la TXNRD1 afecta a las células precursoras neuronales y participa en la regulación del desarrollo neuronal [164].

Las selenoproteínas DIO2 media la transformación de la T4 en T3 activa en los astrocitos, y la DIO3 degrada T3 y T4 en las neuronas para estabilizar la homeostasis de hormonas tiroideas en el cerebro [165].

1.5 Interacciones biológicas del selenio

Los seres vivos estamos expuestos a una gran variedad de elementos tóxicos y esenciales que pueden interaccionar entre ellos. En la literatura se han descrito numerosas interacciones antagónicas y sinérgicas entre elementos [166]. En el caso del Se, es un conocido antagonista contra una gran cantidad de contaminantes, incluidos el mercurio, el arsénico y los contaminantes orgánicos [167,168].

1.5.1 Interacción Cd/Se

El cadmio (Cd) es un metal altamente tóxico presente en el medio ambiente como consecuencia de los procesos naturales y antropogénicos. Este metal se libera al medio ambiente principalmente a partir de la industria de metales no ferrosos, la quema de combustibles fósiles y la incineración de desechos [169,170]. El uso de fertilizantes fosfatados en las tierras agrícolas también puede contribuir a la contaminación por Cd [171]. Una vez introducido en el medio ambiente, este elemento se acumula en el suelo y es absorbido por las plantas cultivadas para el consumo humano [172]. Dichos productos constituyen la principal fuente de exposición al Cd para la población en general, pero también se puede absorber una gran cantidad de Cd al fumar cigarrillos [173].

La toxicidad del Cd depende de la dosis, vía y duración de exposición, provocando numerosos efectos nocivos en humanos. El Cd no es eliminado fácilmente del organismo, por lo que los niveles de este elemento en personas expuestas aumentan gradualmente a lo largo

de la vida, ocasionando fallos en la reproducción [174], daño en el DNA [175] y está implicado en el desarrollo de numerosos tipos de cáncer [176].

Los estudios en animales han puesto de manifiesto el efecto protector del Se frente al Cd en los órganos más sensibles a la toxicidad de este elemento, como son el hígado y el riñón. En ratones tratados con diseleniuro de difenilo en combinación con cloruro de cadmio (CdCl_2) se ha observado una restauración en los niveles de peroxidación lipídica [177]. Newairy et al. [178] mostraron que las ratas a CdCl_2 exhibieron un aumento en los niveles hepáticos de malondialdehído (MDA) y una reducción del contenido de la glutatión reducida (GSH) y la actividad de selenoenzimas. Sin embargo, el uso de selenito sódico (Na_2SeO_3) durante la exposición a CdCl_2 redujo los efectos nocivos. Por otro lado, en ensayos de exposición del ratón de laboratorio *Mus musculus* a Cd y Se se ha demostrado el papel protector de este elemento mediante el transporte de Cd del hígado al riñón, a través de la SelenoP y la inducción de un complejo Cd-metalotioneína para su excreción en la orina [179]

En otros estudios similares [180] el uso de Na_2SeO_3 redujo la generación de estrés oxidativo inducido por CdCl_2 en riñón de rata [181] y testículos de gallo [182].

El efecto protector del Se depende también de su forma química. Un estudio reciente en ratones alimentados con arroz enriquecido en Se (en forma de Se orgánico) [183] ha demostrado que esta dieta mejora la capacidad antioxidante total, la superóxido dismutasa (SOD) y las actividades enzimáticas de la GSH peroxidasa (GSH-Px) en hígados y riñones de ratones, mientras que disminuye significativamente el contenido de malondialdehído (MDA). Además, el grado de daño fisiológico en ratones con un envenenamiento bajo en cadmio se alivió significativamente y se incrementó la expresión de genes antioxidantes (Nrf-2, GPX1, TrxR2, TNF-2). El uso de polisacáridos de Se provenientes de *Spirulina platensis* también ha demostrado su efecto frente a la toxicidad del Cd en ratas [184].

El uso de cloruro de selenio (IV) (SeCl_4) en combinación con L-carnitina reduce la incidencia del CdCl_2 en ratones, aumentando los niveles de alanina transaminasa y aspartato

aminotransferasa, y reduciendo el estrés oxidativo a niveles normales. Por otro lado, la combinación de SeCl_4 y L-carnitina tiene un alto efecto sinérgico, provocando un aumento de enzimas antioxidantes y una disminución de la peroxidación lipídica [185].

1.5.2 Modelos *in vitro* para estudios Cd/Se. Líneas celulares.

La evaluación del impacto de los contaminantes ambientales en organismos vivos requiere del uso de organismos modelos (bioindicadores) y de la medida de los diferentes biomarcadores que pueden ser proteínas, transcritos, metabolitos o bacterias. Siguiendo uno de los principios de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) en experimentación animal, se ha llevado a cabo la búsqueda de nuevas alternativas al uso de animales. Ello ha permitido el desarrollo de nuevos procedimientos como los modelos matemáticos o las técnicas *in vitro* como el uso de líneas celulares [186].

El cultivo de células tiene su origen en el siglo XIX, pero no fue hasta 1952 cuando el Dr. George Gey estableció la primera línea celular humana obtenida de una muestra de cáncer cervicouterino, las células HeLa. El uso de líneas celulares ha asumido un papel importante en el estudio de los procesos fisiológicos, fisiopatológicos y de diferenciación celular, permitiendo el estudio de alteraciones en la estructura, biología y composición genética de las células en entornos controlados [187].

Las líneas celulares obtenidas a partir de líneas celulares transformadas *in vitro* o de células cancerosas son líneas celulares indefinidas y se pueden cultivar en monocapa o en forma de suspensión. Estas células se dividen rápidamente con un tiempo de generación de 12 a 14 horas y tienen el potencial de ser subcultivadas indefinidamente [188].

La línea celular HepG2 consta de células de carcinoma hepático humano, derivadas del tejido hepático de un varón caucásico de 15 años que tenía un carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Esta línea celular se usa comúnmente en estudios de hepatotoxicidad y metabolismo de fármacos. Las células HepG2 exhiben una morfología similar a la epitelial

con un número de cromosomas modal de 55, son no tumorgénicas y tienen altas tasas de proliferación [189].

Las células HepG2 tienen propiedades adherentes y crecen en forma de monocapas en pequeños agregados. HepG2 puede cultivarse con éxito a gran escala y estimularse con hormona de crecimiento humana. También son capaces de secretar muchas proteínas plasmáticas, como la transferrina, el fibrinógeno, el plasminógeno y la albúmina [189]. Las células HepG2 son un modelo *in vitro* ideal ya que expresa muchas de las funciones atribuidas a los hepatocitos humanos normales.

Las células HepG2 se han empleado en numerosos estudios para elucidar los mecanismos de citotoxicidad frente al Cd [190] y para comprender la transformación intracelular de este metal y su posterior migración a otros tejidos[191]. En el caso del Se, se emplea como cultivo modelo para evaluar las propiedades quimiopreventivas de sus compuestos [192,193]. Respecto a la interacción Cd/Se, la mayoría de los estudios que emplean esta línea celular están enfocados en el uso de quantum dots (QDs), unos nanomateriales fluorescentes de alto rendimiento con un amplio rango de aplicación biomédico y terapéutico. [194–196].

El efecto protector del Se se ha estudiado también en otras líneas celulares. La línea celular de neuroblastoma catecolaminérgico SH-SY5Y demostró que el tratamiento con CdCl_2 10 μM durante 24 h provoca modificaciones significativas tanto en términos de estrés oxidativo como de brotación neuronal, desencadenadas por el estrés del retículo endoplásmico (RE). La evaluación de la efectividad de los tratamientos con 50 μM de cloruro de zinc (ZnCl_2) y 100 nM de selenito de sodio (Na_2SeO_3) mostró que ambos elementos fueron capaces de atenuar la neurotoxicidad dependiente de Cd [197].

Los resultados del estudio de Ren et al. [198] revelaron que el pretratamiento con selenio suprime notablemente la apoptosis inducida por cadmio en la línea celular TM3 de las células de Leydig. Además, disminuye el nivel de ROS y se bloquea la vía de señalización

JNK. En la línea celular aviar LMH, la intervención de Se inhibió la liberación de LDH inducida por Cd y la diafonía del estrés del RE y la autofagia mediante la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. También, el Se mitigó la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular inducida por Cd mediante la vía de señalización de Ca^{2+} /calmodulina (CaM)/calmodulina quinasa IV (CaMK-IV) [199].

Las líneas celulares de hígado humano normal (HL-7702) y de riñón embrionario humano (HEK293) se han empleado para evaluar el efecto protector de polisacáridos de Se provenientes de *Spirulina platensis* frente al Cd [184].

2. Ciencias ómicas

Las ciencias ómicas han supuesto una poderosa herramienta para el estudio de la respuesta biológica de un organismo frente a estímulos fisiopatológicos o modificación genética [200]. En este sentido, se engloban los campos de estudio tales como genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica y que se recogen la denominada 'cascada de las ómicas' (Figura 10)[201]. Concretamente, la genómica es la ciencia que estudia la estructura, evolución, caracterización y cuantificación de los genes. La transcriptómica, se define como el estudio del conjunto de ARN expresado en un organismo. El término proteómica se refiere a la ciencia que estudia aquellas proteínas que están relacionadas con determinadas propiedades y funciones bioquímicas. La metabolómica es la última etapa de la cascada de las ómicas. Esta disciplina estudia el conjunto de metabolitos presentes o ausentes que están involucrados en los procesos metabólicos de un sistema biológico [202].

Mientras la genómica y la proteómica nos indican lo que puede pasar en un organismo, bajo determinadas situaciones, la metabolómica nos indica lo que realmente ha pasado y por lo tanto ofrece una visión más realista de los mecanismos biológicos complejos de un organismo [203].

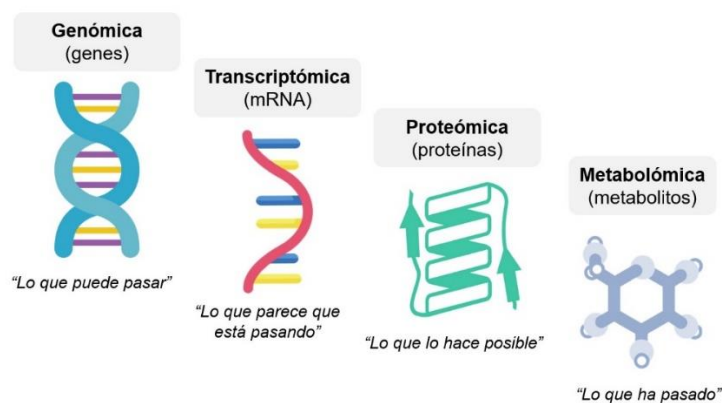


Figura 10. Cascada de las ómicas.

En los últimos años, han emergido nuevas subdisciplinas como la lipidómica [204,205], alimentómica (*foodomics*) [206,207], metalómica [208–210] o fluxómica [211,212], demostrando que las ciencias ómicas están en continuo desarrollo y evolución.

2.1. Metabolómica

Los metabolitos son moléculas de baja y media masa molecular que intervienen en los procesos celulares y cuyos niveles nos revelan la situación del metabolismo en un órgano determinado o en un ser vivo [213]. El metaboloma representa una gran variedad de clases de compuestos tales como aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos y nucleótidos entre otros [214].

Los estudios metabolómicos abarcan un análisis multicomponente de diferentes matrices biológicas (orina [215], suero [216], plasma [217], tejidos de origen animal [218] o vegetal [219] y extractos celulares [220] entre otros, los cuales requieren diferentes aproximaciones y plataformas analíticas.

2.1.1 Aproximaciones metodológicas utilizadas en metabolómica

Desde un punto de vista metodológico, se establecen dos estrategias o aproximaciones en función de la información previa disponible: análisis no dirigido (*non-targeted*) y análisis dirigido (*targeted*) [214].

Los análisis dirigidos se refieren a una medida cuantitativa de un grupo de metabolitos seleccionados, por tanto, se requiere un conocimiento *a priori* de los compuestos de interés, normalmente aquellos asociados a una determinada ruta metabólica, lo que permite escoger y optimizar el método para su análisis [221–223].

Por otra parte, los análisis no dirigidos involucran un análisis global de la composición del metaboloma bajo unas condiciones determinadas, con el objetivo de identificar [221]metabolitos específicos que caractericen a la muestra (biomarcadores). La principal limitación de esta aproximación es que se requieren de diversos métodos analíticos complementarios para detectar un mayor número de metabolitos y abarcar todo el metaboloma [223]. A su vez, los análisis no dirigidos se pueden subdividir en:

- **Huella dactilar metabólica (*metabolic fingerprinting*):** análisis global para clasificar las muestras basándose en patrones de cambios en respuesta a una enfermedad, cambios medioambientales o distorsiones genéticas con el objetivo de identificar metabolitos discriminantes [224].
- **Huella pedicular metabólica (*metabolic footprinting*):** análisis de los metabolitos extracelulares en un medio de cultivo celular como consecuencia de la absorción o excreción de las células [225].

Los experimentos metabólicos se caracterizan por una serie de pasos comunes a todas ellas (*workflow*), en la que la reproducibilidad analítica y técnica, así como el análisis de los datos son la pieza clave para un experimento satisfactorio. Las etapas de las que consta se muestran en la Figura 11.



Figura 11. Workflow general para estudios metabolómicos.

- 1. Toma de muestras:** Un requisito indispensable a la hora de abordar los estudios metabolómicos es asegurarse de que las muestras recogidas reflejen y representen la biología en cuestión. Además, el número de muestras ha de ser elevado para obtener resultados estadísticos válidos.
- 2. Preparación de muestras:** en base al tipo de muestra, analito y plataforma analítica a utilizar, es necesario seleccionar un tipo de preparación u otro.
- 3. Análisis de muestras:** las técnicas analíticas mayormente empleadas suelen ser la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR).
- 4. Procesado de los datos obtenidos:** debido a la complejidad y el elevado número de datos resultantes, éstos han de ser pre-procesados mediante técnicas adecuadas de software.
- 5. Análisis de datos:** los datos obtenidos se someten a análisis estadísticos univariantes y multivariantes que permiten visualizar y diferenciar los grupos de estudio.
- 6. Identificación de biomarcadores:** determinación de la estructura química con la ayuda de bases de datos y técnicas de fragmentación como MS/MS.
- 7. Análisis de las rutas metabolómicas:** los grupos de metabolitos que están relacionados con el mismo proceso biológico pueden estar situados en una única ruta metabólica, para ello, se emplean bases de datos disponibles como Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) o MetaboAnalyst.
- 8. Interpretación de los resultados.**

2.1.2 Técnicas analíticas en metabolómica

Debido a la complejidad de los metabolitos y al elevado número de ellos en una muestra, se requieren de técnicas analíticas de alta resolución. Por lo general, la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) constituyen las dos técnicas principalmente empleadas a la hora de abordar un análisis metabolómico [226–228]. En la Tabla 7, se recogen a continuación las principales diferencias entre la MS y la NMR. El uso de estas técnicas posee los siguientes requisitos:

- Elevada reproducibilidad para minimizar la variación analítica.
- Cubrir una gran variedad de metabolitos con diferentes propiedades fisicoquímicas.
- Poseer un elevado rango dinámico que permita analizar las diferencias en la abundancia de los metabolitos
- Alta sensibilidad para detectar y cuantificar los metabolitos que se encuentran en una baja abundancia.
- Poseer una alta resolución capaz de separar las especies isobáricas y que permita la identificación de compuestos y/o su elucidación estructural.

	Resonancia Magnética Nuclear	Espectrometría de masas
Sensibilidad	Baja	Alta
Reproducibilidad	Muy alta	Media
Nº metabolitos	30-100	300-1000 (GC-MS o LC-MS)
Análisis dirigido	No óptimo para análisis dirigido	Mejor para análisis dirigido
Preparación de muestra	Preparación mínima	Preparación más compleja
Extracción de tejidos	No requiere	Requiere extracción
Tiempo de análisis	Rápido-la muestra entera puede analizarse en una sola medida	Mayor que RMN-requiere diferentes técnicas cromatográficas
Coste del instrumento	Más caro y mayor espacio que MS	Más barato y menor espacio
Coste de la muestra	Bajo coste	Alto coste

Tabla 7. Comparación de las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS) [229]

2.1.3 Espectrometría de masas para estudios metabolómicos

La espectrometría de masas (MS) es la técnica por excelencia en los estudios metabolómicos gracias a su alta sensibilidad para la detección, cuantificación y elucidación estructural de cientos de metabolitos en un solo análisis [230]. La MS se fundamenta en la formación de iones a partir de átomos o moléculas y su mediada en base a su ratio masa/carga (m/z) [231]. En la figura 12 se representan los componentes básicos de un MS genérico. En términos generales, la muestra es introducida a través de un sistema de entrada. Los iones se forman a partir de las moléculas neutras en la fuente de iones. Éstos son acelerados a la salida de la fuente por una diferencia de potencial y son guiados hacia el analizador de masas, el cual separa los iones en las diferentes m/z . Tras la separación, el detector recoge su abundancia y la amplifica en forma de señal que es digitalizada y transferida a un ordenador, donde aparece el espectro de masas[232].

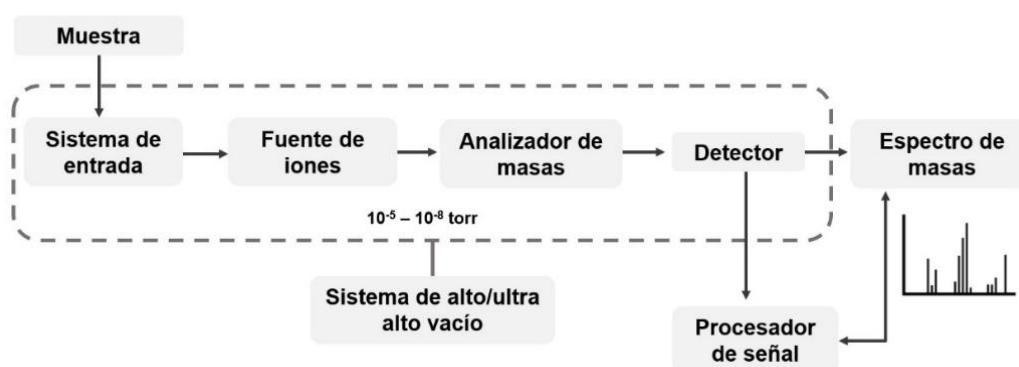


Figura 12. Esquema de las características principales de un espectrómetro de masas

A continuación, se detallan cada uno de los componentes de un MS.

- Introducción de muestra

La introducción de la muestra al MS puede hacerse mediante infusión directa (DI) o debido a la complejidad de las matrices biológicas, a veces es necesario separar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos de interés previo a la adquisición mediante MS. Las técnicas de separación incluyen la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC) y la electroforesis capilar (CE) [233]. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han empleado

las técnicas híbridas de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de ultra alta eficacia-espectrometría de masas (UHPLC-QTOF-MS) para los estudios metabolómicos.

- Infusión directa (DI):

La DI es una técnica que se caracteriza por su rapidez y sencillez, así como una elevada sensibilidad y reproducibilidad. Su principal inconveniente es la interferencia que representan las sales presentes en los extractos que pueden disminuir la sensibilidad [234].

- Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases-espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más utilizadas en estudios metabolómicos, ideal para metabolitos de baja masa molecular (<650 Da) como aminoácidos, azúcares y ácidos grasos [235,236]. Su versatilidad radica en su robustez, excelente capacidad de separación, selectividad, sensibilidad y reproducibilidad [237,238]. Otra de sus ventajas es la disponibilidad de numerosas bases de datos de masas espectrales o librerías que permiten la identificación de los compuestos [238].

El fundamento de esta técnica se basa en la separación de los componentes de una muestra vaporizada como consecuencia de su reparto entre una fase móvil gaseosa y otra fase estacionaria sólida mantenida en una columna [239]. Los componentes básicos de un instrumento de GC-MS se muestran en la Figura 13.

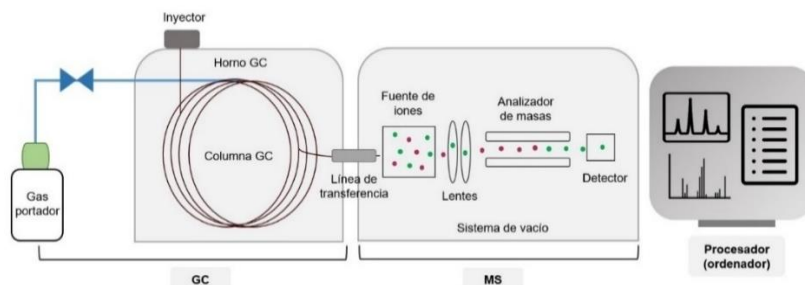


Figura 13. Esquema general de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas típico

- Cromatografía líquida (LC)

La cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) es una de las plataformas predominantes en los estudios metabolómicos, debido a su gran versatilidad que permite la separación de compuestos en un amplio rango de polaridad [240]. Esto se debe a la capacidad de trabajar con columnas de diferentes interacciones químicas. En la LC, se utiliza una fase móvil líquida que se somete a una alta presión a través de una fase estacionaria sólida (columna). La principal ventaja de la LC frente a la GC es que no se requiere que los analitos sean volátiles. Los tipos de LC suelen clasificarse según el mecanismo de separación o tipo de fase estacionaria (Tabla 8) [239].

	Fase estacionaria	Fase móvil	Principio de la separación	Especies químicas
Fase normal (NP)	Sólido polar	Líquido apolar	Solubilidad Adsorción	Moléculas neutras discretas
Fase reversa (RP)	Sólido/líquido apolar	Líquido polar	Solubilidad Adsorción	Moléculas neutras discretas
Intercambio iónico (AEC/CEC)	Sólido intercambiador	Líquido acuo-salino (con iones)	Polarizabilidad	Especies iónicas
Exclusión molecular (SEC)	Sólido poroso	Líquido	Tamaño molecular	Moléculas neutras polímeras
Afinidad (AF)	Sólidos con centros específicos	Líquido acuoso	Interacción enzima/sustrato	Especies bioquímicas activas

Tabla 8. Clasificación de los tipos de cromatografía líquida

- Fuentes de ionización

Existen numerosas fuentes de ionización y su rango de aplicación está relacionado con el tamaño y la polaridad del analito. Para los compuestos que presentan alta polaridad y elevado peso molecular (masas mayores de 10000 Da) la fuente de ionización empleada es la ionización por electrospray (ESI) y para compuestos de menor polaridad se prefieren las técnicas de la ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión

atmosférica (APPI) (Figura 14). Para la técnica de GC-MS, la fuente de ionización por excelencia es mediante impacto electrónico (EI) [241].

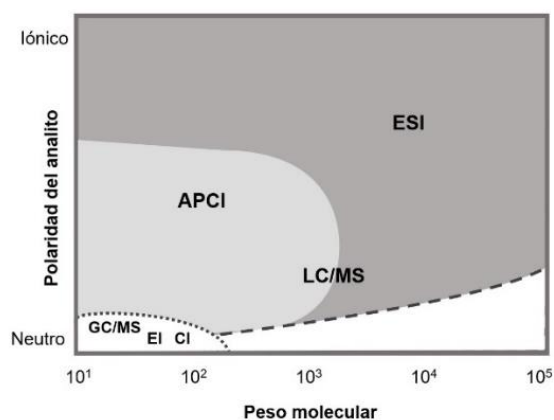


Figura 14. Aplicabilidad de las fuentes de ionización en función de la polaridad y el tamaño del analito.

- Impacto electrónico (EI)

Las moléculas de analito (M) son bombardeadas con electrones provenientes de la fuente de iones produciendo M^+ y sus fragmentos MH^+ . El filamento de la lámpara de EI, normalmente tungsteno o renio, bajo condiciones de vacío y cuando una corriente pasa a través del cátodo alcanza una temperatura de 2000°C. El filamento caliente produce electrones, y cuando la energía del electrón es mayor que el potencial de ionización de la muestra, las moléculas o átomos de la muestra se ionizan. Los iones ganan una energía cinética en el campo eléctrico y entran al analizador de masas. Convencionalmente, sólo se estudian los iones positivos y para obtener un espectro de masas reproducible se aplica una energía general de 70 eV [241].

- Ionización química (CI)

La CI es menos convencional que el EI como fuente de ionización. Los iones se producen de forma suave, sin fragmentar mucho la molécula de analito (M). Se bombardea un gas reactivo, normalmente metano, con electrones para producir CH_5^+ que transfiere H^+ a M, formando MH^+ [231].

- Ionización química a presión atmosférica (APCI)

La APCI utiliza calefacción y un flujo coaxial de N_2 para convertir el eluato en una fina nube de aerosol evaporándose al mismo tiempo el disolvente. Para que el analito M pueda ser observado, debe ser capaz de generar el ion protonado MH^+ . La generación de las especies ionizadas del tipo MH^+ (también es posible generar especies M^-), se ioniza el gas aplicando un alto voltaje y, a través de subsiguientes reacciones en fase gaseosa se generan los iones moleculares. La principal ventaja de la APCI frente a la EI es la poca fragmentación de los iones moleculares debido al uso de condiciones más “suaves” [231].

- Fotoionización a presión atmosférica (APPI)

En la APPI un haz de luz UV reemplaza al plasma utilizado en la APCI, lo que la convierte en una alternativa a dicha técnica de ionización [242].

- Ionización por electrospray (ESI)

En la ESI (Figura 15) se utiliza una aguja que incorpora dos flujos concéntricos, el flujo interior está formado por una disolución que contiene la muestra, la cual se somete a un campo eléctrico de 3-4 kV, formándose gotas pequeñas cargadas eléctricamente. El flujo exterior lo forma un segundo líquido que se mezcla con la muestra y modifica el contenido de los iones, favoreciendo un mejor contacto eléctrico con el metal. Las gotas formadas tienen una carga neta que hace que sean atraídos a un electrodo bajo la acción de un campo eléctrico, que le hace recorrer un trayecto hasta alcanzar el selector de masas.

En ese recorrido, el disolvente se va evaporando y las gotas que se mueven a contracorriente, se reducen de tamaño y por consiguiente los iones se ven forzados a aproximarse hasta alcanzar el límite de Rayleigh, punto en el que la repulsión electrostática de los iones se hace mayor que la tensión superficial que mantiene agregado el disolvente, haciendo que estas pequeñas gotas se rompan y liberen los iones, este proceso se denomina evaporación de iones [242]

Es una técnica extremadamente útil para el análisis de moléculas cargadas, grandes y no volátiles como proteínas y ácidos nucleicos. La ESI es la menos agresiva de las técnicas de ionización. Dependiendo de la velocidad de flujo podemos encontrar otras variantes que trabajan a flujos inferiores de $10 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ como microelectrospray, nanoelectrospray y nanospray [242].

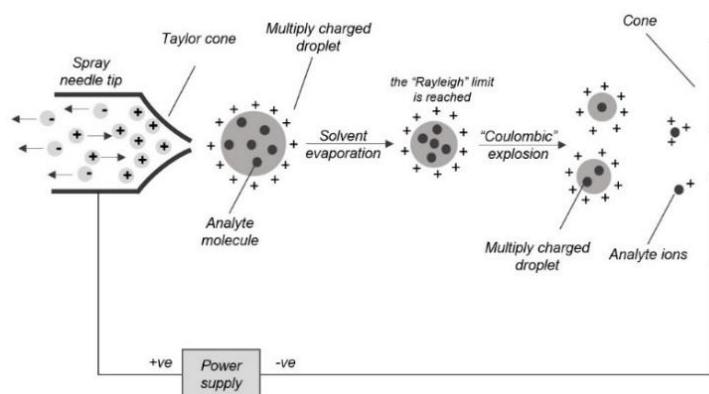


Figura 15. Esquema del proceso de ionización por electrospray (ESI).

- Analizadores de masa

El objetivo de un analizador de masas es limitar los iones que llegan al detector en función de la relación m/z . El poder de resolución de un MS está determinado por las prestaciones del analizador de masas. En metabolómica los analizadores más comunes son el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF) y el sistema híbrido triple cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqQ-TOF). Existen otros analizadores como el sector magnético, trampa de iones (IT) o ciclotrón iónico por transformada de Fourier (FTICR). En la tabla 9, se detalla el fundamento de los diversos analizadores de masas más habituales.

ANALIZADOR	FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS
Sector magnético	Deflexión de iones en un campo magnético. Las trayectorias de los iones dependen del valor m/z .
Doble enfoque	Enfoque electrostático seguido de deflexión por campo magnético. La trayectoria depende de los valores de m/z .
Cuadrupolo	Movimiento de iones en campos de radiofrecuencias y corriente continua. Sólo pasan iones que tienen ciertos valores de m/z .
Trampa de iones	Almacenamiento de iones en un espacio definido por electrodos. El campo eléctrico expulsa secuencialmente los iones de valores de m/z crecientes.
Resonancia de iones-ciclotrón	Atrapamiento de iones en una celda cúbica bajo influencia de un campo magnético y voltaje de atrapamiento. La frecuencia orbital se relaciona inversamente con el valor de m/z .
Tiempo de vuelo	Los iones con la misma energía cinética entran en el tubo de deriva. La velocidad de deriva y el tiempo de llegada al detector dependen de la masa.

Tabla 9. Analizadores más frecuentes en espectrometría de masas

A menudo se necesita más información estructural que la que proporciona el método de ionización. Esta información puede ser obtenida acoplando dos analizadores separados por una celda de colisión, que constituye la espectrometría de masas en tándem (MS/MS o MS²). En el estudio de los perfiles metabolómicos el sistema híbrido QqQ-TOF permite una elevada sensibilidad y resolución, y puede ser usada para la cuantificación de compuestos, ya que la calidad y cantidad de información proporcionada mediante MS/MS es superior a la obtenida por MS [230,243].

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en línea recta. El primer cuadrupolo (Q1) selecciona el ion de interés (ión precursor) y se le pone en contacto con el gas de colisión en un segundo cuadrupolo (Q2) que produce la fragmentación del ión precursor mediante el proceso denominado CID (disociación inducida por colisión). Los iones resultantes se escanean el tercer cuadrupolo (Q3) y finalmente, el TOF actúa como analizador de masas.

- Detectores

Los detectores empleados en MS convierten la señal eléctrica para que pueda ser procesada, almacenada y mostrada. Los más comunes son los electromultiplicadores (EM) y fotomultiplicadores (PM).

- Electromultiplicador (EM)

El proceso básico que permite operar a un EM se denomina emisión secundaria de electrones. Cuando una partícula cargada (ion o electrón) choca con una superficie, causa electrones secundarios que son lanzados a una capa superficial. El número de electrones secundarios dependerá del tipo de partícula primaria, su energía y las características de la superficie incidente. Existen dos formas básicas de EM en MS: el dinodo-discreto y el dinodo-continuo. Un dinodo-discreto típico consta de entre 12-24 dinodos que aportan una ganancia de entre 10^4 - 10^8 .

- Fotomultiplicador (PM)

En un fotomultiplicador los iones iniciales golpean un dinodo el cual resulta en una emisión eléctrica. Estos electrones entonces golpean una pantalla de fósforo la cual libera una explosión de fotones. Los fotones pasan a través del multiplicador donde ocurre la cascada de amplificación.

2.2 Espectrometría de masas para la determinación multielemental y selenoproteínas

La técnica por excelencia para la determinación multielemental en el sector medioambiental [244], geológico [245] biomédico [246] y de aplicaciones nucleares [247] es la espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) [248]. A pesar de compartir características con otras técnicas espectroscópicas como la absorción atómica de llama (FAA), la atomización electrotérmica (ETA) o la espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), el ICP-MS posee numerosas ventajas [249,250]:

- Robustez para todas las matrices de muestras analizadas.
- Alta sensibilidad y bajos límites de detección: permite cuantificar a nivel de trazas (ppt) hasta mayor cantidad de concentración (ppm)
- Capacidad de análisis multielemental, esto supone un menor tiempo de análisis, mayor productividad y menor coste de análisis.
- Alta reproducibilidad
- Buen control de interferencias
- Posibilidad de realizar una cuantificación por dilución isotópica.

En la tabla 10, se resumen las principales diferencias de las técnicas atómicas.

	FAAS	GF-AAS	ICP-OES	ICP-MS
LOD (ng/g)	10-1000	0,01-1	0,1-10	0,00001-0,0001
Intervalo lineal	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ⁸
Precisión				
<i>A corto plazo</i>	0,1-1 %	0,5-5%	0,1-2%	0,5-2%
<i>A largo plazo</i>	1-10%	1-10%	1-5%	<5%
Interferencias				
<i>Espectrales</i>	muy pocas	muy pocas	muchas	pocas
<i>Químicas</i>	muchas	muchísimas	muy pocas	algunas
<i>De masa</i>	-	-	-	muchas
Rapidez del análisis	10-15 s/elemento	3-4 min/elemento	6-60 s/elemento	3-4 min todos los elementos
Sólidos disueltos	0,5-5%	>20%	1-20%	0,1-0,4%
Volumen de muestra	grande	muy pequeña	media	media
Coste de adquisición	1	2	4-9	10-15

Tabla 10. Comparación de técnicas atómicas. FAAS: absorción atómica de llama; GF-AAS: absorción atómica-horno de grafito; ICP-OES: espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo; ICP-MS: espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo.

Existen seis componentes básicos de un instrumento de ICP-MS que se detallan en la Figura 16: Sistema de introducción de muestra, plasma de acoplamiento inductivo (ICP), interfase, óptica, analizador de masas y detector [251].

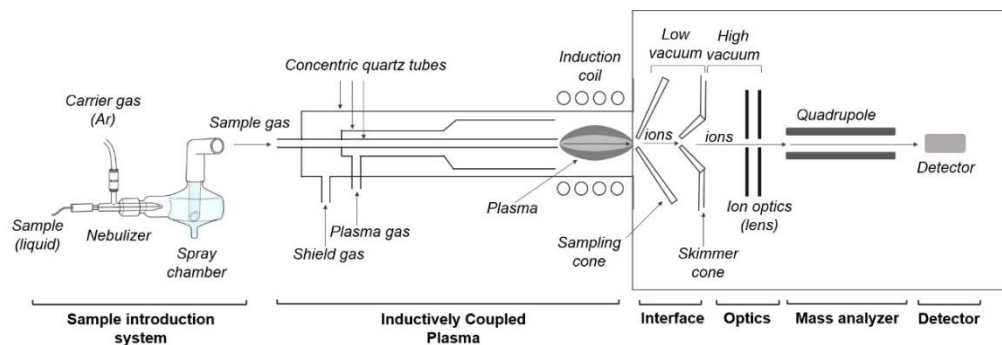


Figura 16. Componentes básicos de un instrumento de espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

En esta técnica, la muestra, normalmente en estado líquido, se introduce al nebulizador con la ayuda de una bomba peristáltica, donde se convierte en un fino aerosol al entrar en contacto con gas argón. Las finas gotas de aerosol se separan de las grandes gotas en la cámara de nebulización (*spray chamber*) donde luego serán transportadas hasta la antorcha que servirá de fuente de ionización gracias a la presencia de un campo magnético con gas Ar. La antorcha consta generalmente de tres tubos concéntricos de cuarzo por los que fluye el gas Ar. El campo magnético se genera por una bobina de radiofrecuencia a 27-20 MHz. Cuando se aplica una chispa de alto voltaje, el gas Ar se ioniza para formar un plasma de alta temperatura (6000-10000 °K).

Los iones producidos en la antorcha se introducen a través de una interfase de vacío diferencial en la que se encuentran dos discos cónicos, normalmente de Ni o Pt, los cuales contienen un orificio centra. El cono exterior (*sampling cone*) tiene un orificio de aproximadamente 1 mm, mientras que el cono interior (*skimmer cone*) tiene un diámetro inferior de <0.75 mm. Entre ambos conos se mantiene una reducción de la presión, haciendo que el haz de iones que entra se expanda detrás del *sampling cone*, de modo que sólo pasen iones de una forma constante y representativa. Los iones pasan a través de un conjunto de

lentes cargadas positivamente que logran la discriminación de masas mínimas y su enfoque de hacia el analizador. Previo al analizador de masas, se encuentra la celda de reacción/colisión que se emplea para eliminar o atenuar las interferencias poliatómicas mediante la introducción de un gas (He , O_2 , H_2 o NH_3) que impacta con el flujo de iones. El analizador de masas, generalmente un cuadrupolo, filtra los iones permitiendo así que sólo lleguen al detector los iones deseados de una determinada m/z . Los espectros obtenidos consisten en una serie sencilla de picos correspondientes a los isótopos de cada elemento y se utilizan para la determinación cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa de los elementos presentes en la muestra, mediante curvas de calibrado en las que se representa el cociente entre el recuento de iones para el analito respecto del recuento para un patrón interno, en función de la concentración.

A pesar de todas las ventajas, el ICP-MS posee algunas limitaciones como:

- Supresión de la ionización o problemas en la interfase. Las muestras con alto contenido de matriz ($>0.3\%$) puede provocar un bloqueo de los conos y deriva de la señal, originando una pérdida de sensibilidad y resultados inexactos. Para minimizar estos efectos, se puede diluir la muestra o emplear la adición de patrones internos [252,253].

- Presencia de interferencias espectrales. Éstas se deben a la presencia de elementos o compuestos con la misma relación m/z que el isótopo de interés. Si las interferencias son debidas a iones atómicos o moleculares se denominan interferencias isobáricas o monoatómicas e interferencias poliatómicas respectivamente. Para la eliminación de estas interferencias se emplean ecuaciones de corrección o el uso de las celdas de colisión/reacción [254,255].

- **Modo reacción:** un gas reactivo (CH_4 , O_2 , H_2 o NH_3) reacciona con la interferencia y la convierte en otras especies de diferente m/z , eliminando así la interferencia. Sus limitaciones radican en que se debe identificar la interferencia que ha de ser sencilla y constante. Por otro lado, el gas reacciona también con la matriz y analitos que

pueden crear nuevas interferencias, por lo que no se aconseja para matrices complejas.

- **Modo colisión:** Un gas de celda inerte (He) colisiona con el ion en la celda. Los iones poliatómicos debido a que tienen un mayor tamaño colisionan más, perdiendo más energía que son entonces eliminados por discriminación de energía cinética (KED). De esta forma, se eliminan múltiples interferencias bajo las mismas condiciones, no es necesario conocer las especies interferentes y el He, al ser inerte, no reacciona con la matriz de la muestra. Su limitación radica en la poca eficacia para eliminar interferencias del plasma.

3. Microbiota intestinal

La microbiota humana se define como una amplia comunidad compleja y dinámica en la que se incluyen bacterias, virus, arqueas y hongos que habitan en el cuerpo humano [256]. El microbioma se refiere a la colección de genes de la microbiota y sus funciones. La microbiota está involucrada en las funciones inmunológicas, fisiológicas y metabólicas del huésped, y existen numerosos estudios que demuestran el impacto de la microbiota en la salud humana [257–259]. A continuación, se recogen los conceptos básicos usados en los estudios de la microbiota [260].

- **Microbiota:** todos los microorganismos (bacteria, virus, arqueas, etc) presentes en un ambiente.
- **Riqueza:** el número de las diferentes especies presentes en una comunidad
- **Diversidad:** índice matemático que tiene en cuenta el número de las diferentes especies (riqueza) y su proporción dentro de una comunidad (uniformidad).
- **Alfa-diversidad:** índice empleado para caracterizar una comunidad (riqueza, uniformidad, etc.). Representa la diversidad de especies de cada una de las muestras. Por definición abarca dos variables importantes: la riqueza y la abundancia de especies.

- **Beta-diversidad:** índice empleado para comparar comunidades (afiliación y estructura). Es un término para la comparación de muestras entre sí por lo que no es posible calcular un valor para una única muestra.
- **Afiliación:** análisis comunitario que tenga en cuenta qué especies son compartidas entre las comunidades.
- **Estructura:** análisis comunitario que tiene en cuenta cuáles son las especies que están compartidas o no entre comunidades, así como su abundancia relativa (uniformidad).

La colonización microbiana humana comienza en el nacimiento y es similar a la microbiota vaginal materna. Se cree que el parto y la lactancia son decisivos para la composición de la microbiota intestinal en la edad adulta, aunque también influyen los factores externos a internos relacionados con el huésped [261].

La microbiota lleva a cabo una gran variedad de funciones metabólicas, entre las que se incluyen la producción de vitaminas y compuestos bioactivos [262], síntesis de aminoácidos esenciales y no esenciales [263], el metabolismo de carbohidratos no digeribles [264] y la actividad en señalización neuronal, hormonal e inmunológica a través del eje intestino-cerebro (Figura 17) [265]. Además, actúa en los procesos de absorción de nutrientes y ejerce como barrera epitelial frente a los patógenos [266].

3.1 Microbiota intestinal y neurodesarrollo. Eje intestino-cerebro (GBA)

Los conocimientos acerca de la interacción intestino-cerebro han revelado un sistema de comunicación complejo que, no sólo garantiza el mantenimiento adecuado de la homeostasis intestinal, sino también con las funciones cognitivas en lo que se denomina “eje intestino cerebro (GBA)” (Figura 17) [267].

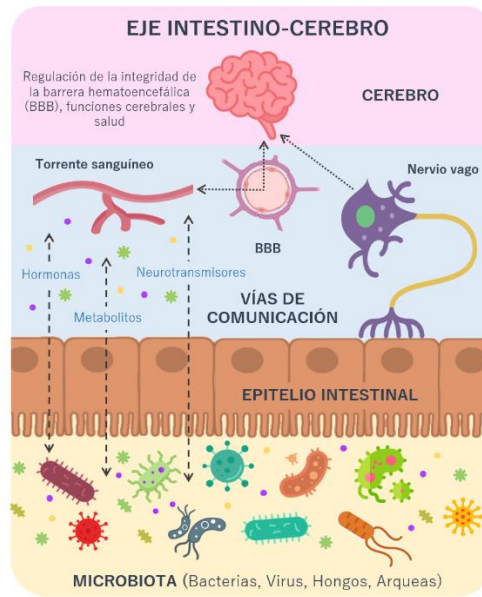


Figura 17. Eje intestino-cerebro.

El GBA consiste en una comunicación bidireccional que incluye al sistema nervioso central (CNS), el sistema nervioso autónomo (ANS), el sistema nervioso entérico (ENS) y el eje hipotalámico-pituitario suprarrenal (HPA). El ANS impulsa las señales aferentes que surgen del lumen y se transmiten a través de las vías entéricas, espinales y vagales al CNS y a su vez, las señales eferentes del CNS a la pared intestinal. El eje HPA se considera un eje eferente del estrés central que coordina las respuestas adaptativas del organismo a los estresores de cualquier tipo [268].

Los últimos estudios han demostrado que la microbiota entérica tiene un impacto crucial en el GBA, interactuando no solo localmente con las células intestinales y el ENS, sino también directamente con el CNS a través de las vías metabólicas y neuroendocrinas. La influencia de la microbiota intestinal en el neurodesarrollo es bien conocida desde principios de la década de los 2000. Los primeros experimentos con ratones libres de gérmenes o tratados con antibióticos, para reducir la diversidad microbiana dentro del intestino han demostrado que numerosos problemas neurológicos como la enfermedad de Alzheimer [269], Parkinson [270], estrés, depresión [271] o la ansiedad [272] están relacionados con la reducción o la falta de microbiota intestinal.

Los neurotransmisores, metabolitos como vitaminas esenciales, ácidos biliares, aminoácidos y los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) modulan muchas de las rutas del sistema inmune [273–275] y por tanto, influyen en enfermedades neurológicas [276], el aprendizaje, la memoria [277] y el comportamiento [278] entre otros.

Las recientes investigaciones han demostrado que la microbiota intestinal puede producir moléculas neuro-activas que contribuyen a la comunicación entre el intestino y el cerebro. Por ejemplo, se ha confirmado que el GABA es producido por las bacterias *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. *Lactobacillus* spp. también produce acetilcolina e histamina; los géneros *Bacillus* spp. y *Escherichia* spp. producen norepinefrina, dopamina y serotonina. La serotonina también puede ser producida por *Streptococcus* spp., y *Enterococcus* spp. [279–283].

Por otro lado, la fermentación bacteriana en el colon produce SCFA y metabolitos como el butirato, propionato y acetato [284]. Los SCFA mantienen la salud intestinal al promover la integridad de la barrera intestinal, la producción de mucus y respaldar la respuesta inflamatoria [285,286]. Sin embargo, su actividad no se limita únicamente al intestino ya que pueden llegar a la circulación sistémica y cruzar la barrera hematoencefálica (BBB) [287] llegando a afectarla. Además, los SCFA pueden modular neurotransmisores, como glutamato, glutamina y GABA [288]. Los metabolitos propionato y el butirato pueden influir en el sistema de señalización celular mediante la modificación de los niveles intracelulares de potasio [289], y regular los niveles de expresión de triptófano 5-hidroxilasa 1, enzima implicada en la síntesis de serotonina, y tirosina hidroxilasa, y por ende, interfiriendo en la biosíntesis de dopamina, adrenalina y noradrenalina [290].

3.2 Microbiota intestinal y reproducción masculina

La microbiota intestinal es lo suficientemente versátil no sólo para interactuar localmente con el tracto intestinal, sino que también posee una red interactiva con otros órganos y tejidos, como el eje intestino-cerebro descrito anteriormente o los ejes intestino-

hígado [291] o intestino-riñón [292]. Recientemente, el impacto de la microbiota intestinal en la reproducción masculina ha recibido un especial interés en la producción de hormonas sexuales y disfunciones testiculares, otorgando una nueva perspectiva a un, todavía no definido, eje intestino-testículo.

Varios estudios han demostrado que las diferencias de género afectan a la composición de la microbiota intestinal y pueden resultar en la predisposición a ciertas enfermedades [293]. Por ejemplo, el género *Prevotella* tiene una fuerte correlación positiva con la testosterona y, por lo tanto, es más abundante en hombres que en mujeres [294]. Además, las mujeres tenían mayor abundancia de *Bacteroides*, mientras que los hombres poseen una menor abundancia de *Clostridia*, *Methanobrevibacter* y *Desulfovibrio* [295]. Las diferencias en las hormonas sexuales parecen ser de alguna manera responsables de esta ocurrencia, aunque los mecanismos involucrados siguen sin conocerse.

En un estudio centrado en los efectos de las bacterias probióticas sobre la obesidad, se expusieron ratones macho a una ingesta de bacterias de ácido láctico purificadas, observándose un mayor desarrollo de los testículos y niveles elevados de testosterona [296]. Poutahidis et al. [297] demostraron que una alimentación suplementada con bacterias *Lactobacillus reuteri* en ratones macho de mayor edad también podría restaurar los niveles de testosterona al nivel de ratones jóvenes. Estos resultados proporcionan evidencias de que la microbiota intestinal puede regular la producción de testosterona y el envejecimiento testicular.

Las especies microbianas, como *Clostridium scindens* y *Ruminococcus gnavus*, tienen la capacidad de convertir los glucocorticoides, la pregnenolona y la hidroxipregnenolona en andrógenos, lo que conduce al aumento de los niveles de dihidrotestosterona y testosterona en el intestino [298]. Otras bacterias como *Butyricicoccus desmolans*, *Clostridium cadaveris*, *Propionimicrobium linfophilum*, *Clostridium scindens* y *Clostridium innocuum* expresan enzimas metabolizadoras de esteroides [299,300].

La microbiota intestinal también puede afectar el desarrollo de los testículos. En ratones macho libre de gérmenes (GF) se ha observado que poseen una menor motilidad espermática, nivel de testosterona intratesticular más bajo o un peso menor de los órganos reproductivos [301,302]. Todos estos estudios han señalado la estrecha relación entre la microbiota intestinal con los procesos de producción y metabolismo de andrógenos y la espermatogénesis, sin embargo, las evidencias no son suficientes para corroborar el eje intestino-testículo.

3.3 Microbiota intestinal y elementos tóxicos/esenciales

La exposición a elementos tóxicos afecta a los mamíferos a nivel celular, resultando en estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alterando proteínas y enzimas, provocando daño estructural, alteraciones en la expresión genética, daño en el DNA y carcinogénesis entre otros [176,303–305].

Los elementos esenciales realizan funciones indispensables para el mantenimiento de un organismo y cuyas deficiencias pueden ocasionar trastornos en las funciones biológicas. El cuerpo humano necesita alrededor de 20 elementos esenciales y 10 de ellos son metales: Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Mo [306,307].

El término disbiosis hace referencia a las alteraciones o desbalance en la composición estructural microbiana. Este desequilibrio de la microbiota normal está relacionado al alto riesgo por desarrollar ciertas enfermedades tales como inflamación intestinal [308], alergias [309], diabetes [310], obesidad [311] y hasta desórdenes neurológicos y cognitivos [312]. Por ello, se han desarrollado estrategias como la suplementación con nutrientes esenciales para manipular el microbiota con el objetivo de prevenir y/o revertir aquellas condiciones que pueden ser dañinas para la salud [313].

La estimación de las interacciones entre los cambios metabólicos causados por los contaminantes ambientales y la microbiota intestinal pueden aportar nuevas evidencias acerca del rol del llamado ‘órgano silencioso’. La exposición a metales tóxicos o esenciales

puede causar disbiosis, y por tanto alterar la composición, diversidad y riqueza de las bacterias intestinales induciendo cambios en su funcionamiento y actividad metabólica. A continuación, se recogen los estudios más relevantes acerca de la microbiota intestinal y la presencia de elementos tóxicos y esenciales en mamíferos.

- Mercurio

El mercurio (Hg), especialmente sus formas orgánicas, es uno de los elementos más tóxicos para la salud en humanos. Los estudios de Rothenberg et al. confirman que la composición del microbioma de las mujeres embarazadas difiere según la concentración de MeHg durante la gestación temprana, además, numerosos taxones estaban correlacionados con los biomarcadores de MeHg [314,315]. Un estudio en roedores ha mostrado cambios en la distribución de diferentes filos, como Firmicutes, Bacteroidetes, y Proteobacteria vinculadas a la exposición a Hg inorgánico que a su vez se correlacionaban con varios genes apoptóticos [316].

- Arsénico

El arsénico (As) es un metaloide presente en el agua, suelo y aire en formas orgánicas e inorgánicas (iAs), siendo éstas especialmente tóxicas provocando enfermedades cardiovasculares y daños en el CNS. Los estudios sobre la exposición a iAs en humanos revelan asociaciones entre los niveles de arsénico en la orina y los cambios en la composición del microbioma. En este sentido, Dong et al. [317] observaron un incremento en la abundancia de Proteobacterias asociadas a la exposición al As del agua potable, mientras que los cambios más significativos detectados por Hoen et al. [318] y Brabec et al. [319] fueron en géneros pertenecientes a los filo Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria. Lu et al. [320] y Li et al. [321] reportaron alteraciones en la microbiota intestinal y en los perfiles metabolómicos de orina, plasma y heces de ratones, estando algunas familias de bacterias intestinales altamente correlacionadas con estos metabolitos alterados.

- Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal altamente tóxico presente en el medioambiente como consecuencia de los procesos naturales y antropogénicos, que causan su entrada y acumulación en la cadena alimentaria. Existen numerosas investigaciones acerca de la exposición a Cd en ratones, obteniendo grandes alteraciones en la microbiota intestinal, pero estos cambios no comparten la misma tendencia en todos los estudios, probablemente debido a las diferencias en el diseño experimental. Por ejemplo, el estudio de Liu et al. [322] señaló un aumento de la abundancia de Firmicutes y Proteobacteria y una disminución de Bacteroidetes, mientras que los resultados de Zhang et al. fueron totalmente opuestos [323].

- Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado ampliamente distribuido en el medio ambiente sin ninguna función biológica en humanos. La exposición a este metal puede causar daños hepáticos y renales, deterioro de la memoria y carcinogénesis. En ratones expuestos a bajas concentraciones a de Pb se observa un aumento de Bacteroidetes y Proteobacteria y una disminución de Firmicutes. Esta tendencia también se observa en humanos con altos niveles de Pb en orina [324–326].

- Manganeso

El manganeso (Mn) es un elemento esencial en la salud humana, estando presente en enzimas como la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) y la manganeso catalasa, sin embargo, una dosis elevada de Mn puede provocar problemas neurológicos similares a la enfermedad de Parkinson o la psicosis esquizofrénica [327]. Los resultados del análisis metabolómico y de microbiota intestinal obtenidos por Wang et al. indican que la exposición a Mn en ratas indujo una disminución de la diversidad bacteriana intestinal, especialmente para *Fusobacteriaceae*, *Prevotellaceae* y *Lactobacillaceae*. Además, la exposición a Mn alteró el metabolismo de la triptamina, el ácido β -hidroxipirúvico, el ácido taurodesoxicólico y el

ácido urocánico, estando estos metabolitos correlacionados con el microbioma alterado [328].

- Cobre

El cobre (Cu) es un elemento esencial que participa en numerosos sistemas enzimáticos y síntesis de proteínas, sin embargo, un exceso de este metal puede ocasionar colestasis o la enfermedad de Wilson [329]. Los efectos del Vu sobre la microbiota intestinal, el metaboloma y las citoquinas proinflamatorias en ratas ha sido estudiado por Zhang et al. [330] y Dai et al. [331], mostrando que los factores de necrosis tumoral (TNF- α) se correlacionaron positiva y negativamente con la abundancia de Firmicutes y Proteobacteria respectivamente.

- Yodo

El yodo (I) es un elemento traza esencial para la biosíntesis de la hormonas tiroideas. Un estudio en ratones obesos mostró respuestas diferentes y opuestas de la microbiota intestinal. Las bacterias *Barnesiella*, *Prevotella*, *Turicibacter*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Faecalibaculum rodentium* y *Burkholderiales* estaban positivamente correlacionadas con el fenotipo de enfermedades tiroideas, mientras que *Lactobacillus*, *F. prausnitzii*, *Enterococcus*, *Blautia* y *Roseburia* estaban correlacionadas negativamente [332].

- Selenio

El selenio es un elemento esencial en humanos ya que contribuye a un correcto funcionamiento del organismo gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias provenientes de las selenoproteínas. La ingesta de Se influye en el estatus de Se, la expresión de las selenoproteínas y también en la composición de la microbiota intestinal. En la siguiente tabla se recogen los principales cambios en la microbiota intestinal en mamíferos expuestos a Se.

Especie química	Organismo	Cambios en microbiota	Referencia
Polisacárido de Se	Ratón	↑ Bacteroidetes ↓ Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria	[333]
Na ₂ SeO ₃	Ratón	Se-deficient diet: ↑ <i>Dorea</i> Se-enriched diet: ↑ <i>Turicibacter</i> , <i>Akkermansia</i> ↓ <i>Mucispirillum</i>	[334]
-	Rata	Té negro deficiente Se + dieta alta en grasa (vs dieta alta en grasa): ↓ <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Flavonifractor</i> , <i>Holdemania</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Allobaculum</i> , <i>Akkermansia</i> Té negro deficiente Se vs Té negro enriquecido Se: ≠ <i>Akkermansia</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Parasutterella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Turicibacter</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Ruminococcus</i> 2, <i>Parvibacter</i> , and <i>Romboutsia</i>	[335]
Na ₂ SeO ₃	Ratón	Se en dieta: ↑ <i>Porphyromonadaceae</i> , <i>Tanarella</i> ↓ <i>Alistipes</i> , <i>Parabacteroides</i>	[336]
Probióticos enriquecidos en Se (SeP)	Cerdo	Dieta con SeP: ↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>E.coli</i> Dieta con iSe: sin cambios	[337]

Tabla 11. Influencia del selenio en la microbiota intestinal de mamíferos modelo.

El estudio de Kasaikina et al. [336] con ratones libres de gérmenes (GF) que fueron alimentados con dietas con diferentes niveles de Se (adecuado y supranutricional) modificaron su expresión del selenoproteoma del suero sanguíneo de manera similar a la del grupo control, pero mostraron niveles de expresión más altos de GPX1 y MSR1 en el hígado. Estos resultados sugieren ‘secuestro’ parcial de Se por parte de los microorganismos intestinales, lo que origina en una disponibilidad limitada para el huésped. Además, el género *Parabacteroides* mostró una correlación negativa con la suplementación de Se.

Zhai et al. [334] también comparó los efectos de diferentes niveles de Se en la dieta (deficiente, adecuado y supranutricional) en la microbiota intestinal de ratones. Para ello, se realizó un trasplante de microbiota fecal de los animales, produciéndose cambios significativos en la composición de la microbiota intestinal. En comparación con la dieta deficiente en Se, la suplementación supranutricional redujo la abundancia de *Dorea* sp. y

aumentó los niveles de bacterias con posibles efectos protectores contra la colitis y la disfunción de la barrera intestinal, como *Turicibacter* y *Akkermansia*.

La absorción de Se por parte las bacterias intestinales pueden influir en la expresión de selenoproteínas en el huésped, dando como resultado niveles de selenoproteínas dos o tres veces más bajos en condiciones limitantes de Se [338]. El estudio de Hrdina et al. [338] ha demostrado que la colonización en ratones GF induce la expresión de varias selenoproteínas en diferentes tejidos, incluso en condiciones de dieta deficiente en Se. Los ratones GF mostraron mayor actividad de GPX y TXNRD1 en el intestino e hígado, y una mayor actividad de GPX1 y GPX2 en colon. El estudio concluyó que los animales GF poseen una menor necesidad de Se para la biosíntesis de selenoproteínas y sufren un mayor riesgo de desarrollar deficiencia de selenoproteínas que los animales convencionales.

3.4 Análisis de la microbiota: metodologías meta-ómicas

El estudio de la microbiota humana puede abordarse mediante diferentes aproximaciones dependiendo de los objetivos del estudio. El conjunto de estas metodologías ómicas se define como meta-ómicas e implica la determinación de genes (metagenómica), regiones del ARN ribosomal (metataxonómica), transcritos (metatranscriptómica), proteínas (metaproteínas) y metabolitos (metabolómica de metabolitos producidos por la microbiota) [339].

3.4.1 Metataxonómica

Los métodos microbiológicos tradicionales para el cultivo de bacterias humanas generalmente se han empleado para aislar e identificar algunas bacterias; sin embargo, hay especies y cepas que requieren condiciones de cultivo complejas que son difíciles de reproducir en un medio de cultivo sintético o, algunas cepas no son cultivables [340]. Los métodos de análisis microbianos han evolucionado a técnicas dependientes de cultivo, incluyendo las metodologías moleculares clásicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la secuenciación de alto rendimiento.

La PCR específica, PCR cuantitativa (qPCR) y metodologías de huellas dactilares (como desnaturalización (DGGE) y electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP) o polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), entre otros) han sido ampliamente utilizados para la elaboración de perfiles de composición de comunidades microbianas [341–343].

Por otro lado, también se utilizan técnicas como matrices bacterianas dirigidas, como el chip del tracto intestinal humano (HITChip) [344] y la hibridación específica *in situ* con fluorescencia (FISH) [345]. Sin embargo, todas estas técnicas han sido reemplazadas rápidamente por el desarrollo de técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS), que junto con el desarrollo de esquemas de trabajo y herramientas bioinformáticas, han aumentado el conocimiento de las comunidades microbianas de una manera confiable y rápida [346].

La técnica estándar actual para la elaboración de perfiles de comunidades microbianas y la empleada en esta Tesis Doctoral es la secuenciación dirigida de amplicones, dirigida principalmente a una región específica del gen hipervariable 16S rRNA [347]. La ventaja principal de esta técnica es que permite distinguir entre distintos microorganismos de una forma mucho más sensible, debido a que cada gen es único de cada especie, sin embargo no es posible diferenciar entre cepas [347].

En la última década se han utilizado varias plataformas con diferentes metodologías, desde pirosecuenciación Roche 454, secuenciación por ligación plataforma SOLID, secuenciación por síntesis plataforma Solexa, sistemas Illumina como HiSeq y MiSeq, Ion Torrent de Life Technologies y la reciente secuenciación Nanopore con Minlon, PacBio y Heliscopio [348].

3.4.2 Metatranscriptómica

La metatranscriptómica nos informa sobre la expresión global de RNA por parte de la comunidad microbiana, proporcionando una vista del perfil funcional activo de una muestra dada en un momento dado y bajo condiciones específicas. Este enfoque también se puede usar para estimar la composición taxonómica de la población microbiana e identificar nuevos sitios de transcripción y/o traducción de genomas microbianos. Los últimos estudios han demostrado que las enfermedades, las intervenciones dietéticas y los xenobióticos alteran significativamente el perfil de expresión génica microbiana [349,350].

3.4.3 Metaproteómica

Esta técnica cuantifica la suma de todas las proteínas de una célula, tejido u organismo bajo unas condiciones particulares, incluyendo su estructura y funciones fisiológicas. También se tiene en cuenta la abundancia de proteínas, su localización, las modificaciones postraduccionales, las isoformas y las interacciones moleculares [351], proporcionando información sobre la verdadera funcionalidad de la microbiota intestinal [352].

La metaproteómica se basa en la espectrometría de masas (MS) para proporcionar información sobre las rutas metabólicas y vías de señalización operativas en la microbiota intestinal. El procedimiento de extracción de proteínas se realiza mediante la lisis celular directa de la materia fecal, la precipitación de proteínas y los procesos de limpieza. La presencia muy abundante de proteínas huésped puede limitar la medición del proteoma microbiano.

En la Tabla 12, se resumen las principales características de las técnicas para el análisis de la microbiota.

Metataxonómica/Metagenómica		
Técnica	Pros	Contras
Secuenciación Sanger	Ofrece información taxonómica	Solo amplificación dirigida y qPCR: sesgada por la amplificación por PCR
Amplificación dirigida (16S rRNA)	Más barato que otras técnicas ómicas	Solo metagenómica: requiere más bioinformática que otros enfoques
Metagómica	Permite evaluar la capacidad funcional, Existe un gran número de herramientas bioinformáticas	No hay información sobre la viabilidad y actividad bacteriana
PCR cuantitativa (qPCR)	Ofrece cuantificación de datos concretos	Sensible a los contaminantes y la degradación del ADN.
Metatranscriptómica		
Técnica	Pros	Contras
Microarrays	Proporciona información de expresión génica y viabilidad	Coste elevado Problemas experimentales: inestabilidad de ARN y degradación enzimática
PCR cuantitativa (qPCR)	Estudio de la función y actividad metabólica de la microbiota	Baja calidad de las bases de datos Sensible al ARN huésped: dificultad en análisis de datos
Secuenciación ARN con NGS	Alta sensibilidad y repetibilidad que la metagenómica	Predicción pobre a nivel de proteína
Metaproteómica		
Técnica	Pros	Contras
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	Generación de gran cantidad de datos Sólo metaproteómica: permite identificación de taxonomía, funciones y rutas metabólicas	Técnicas caras Análisis complejo
Espectrometría de masas (MS) de alta resolución acoplada a técnicas de LC,GC y CE	Perfil metabólico/proteómico global o medida de metabolitos específicos (dirigido)	Baja calidad de las bases de datos Baja identificación de péptidos

Tabla 12. Técnicas para el análisis de la microbiota

4. Referencias

- [1] The biology of selenium, in: *Selenium in Food and Health*, Springer US, Boston, MA, 2006: pp. 20–42. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33244-4_2.
- [2] https://old.iupac.org/publications/ci/2011/3305/5_trofast.html , (n.d.).
- [3] H.J. Reich, R.J. Hondal, Why Nature Chose Selenium, *ACS Chemical Biology*. 11 (2016) 821–841. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00031>.
- [4] G.S. Banuelos, Z.Q. Lin, M.F. Moraes, L.R.G. Guilherme, A.R. dos Reis, *Global Advances in Selenium Research from Theory to Application: Proceedings of the 4th International Conference on Selenium in the Environment and Human Health 2015*, CRC Press, 2015. <https://books.google.es/books?id=BB2vCgAAQBAJ>.
- [5] H. Tian, Z. Ma, X. Chen, H. Zhang, Z. Bao, C. Wei, S. Xie, S. Wu, Geochemical characteristics of selenium and its correlation to other elements and minerals in selenium-enriched rocks in Ziyang County, Shaanxi Province, China, *Journal of Earth Science*. 27 (2016) 763–776. <https://doi.org/10.1007/s12583-016-0700-x>.
- [6] L.H.E. Winkel, B. Vriens, G.D. Jones, L.S. Schneider, E. Pilon-Smits, G.S. Bañuelos, Selenium Cycling Across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review, *Nutrients*. 7 (2015) 4199–4239. <https://doi.org/10.3390/nu7064199>.
- [7] M. Wells, J.F. Stolz, Microbial selenium metabolism: a brief history, biogeochemistry and ecophysiology, *FEMS Microbiology Ecology*. 96 (2020) fiae209. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae209>.
- [8] P.J. White, Selenium accumulation by plants, *Annals of Botany*. 117 (2016) 217–235. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv180>.
- [9] M. Schiavon, E.A.H. Pilon-Smits, The fascinating facets of plant selenium accumulation – biochemistry, physiology, evolution and ecology, *New Phytologist*. 213 (2017) 1582–1596. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14378>.
- [10] Y. Mehdi, J.-L. Hornick, L. Istasse, I. Dufrasne, Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions, *Molecules*. 18 (2013) 3292–3311. <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>.
- [11] H. Wen, J. Carignan, Reviews on atmospheric selenium: Emissions, speciation and fate, *Atmospheric Environment*. 41 (2007) 7151–7165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.07.035>.

- [12] K. Pyrżyńska, Determination of Selenium Species in Environmental Samples, *Microchimica Acta*. 140 (2002) 55–62. <https://doi.org/10.1007/s00604-001-0899-8>.
- [13] <https://www.epa.gov/dwreginfo/drinking-water-regulations> , (n.d.).
- [14] http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75424/WHO_SDE_WSH_03.04_13_eng.pdf , (n.d.).
- [15] M. Kieliszek, Selenium – Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food, *Molecules* (Basel, Switzerland). 24 (2019) 1298. <https://doi.org/10.3390/molecules24071298>.
- [16] M. Soriano-García, Organoselenium Compounds as Potential Therapeutic and Chemopreventive Agents: A Review, 2004.
- [17] I. of Medicine, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, The National Academies Press, Washington, DC, 2000. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- [18] P.M. de C.C. Pereira, A.F. dos R.B. Vicente, Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet, *Meat Science*. 93 (2013) 586–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>.
- [19] J.W. Finley, Bioavailability of Selenium from Foods, *Nutrition Reviews*. 64 (2006) 146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00198.x>.
- [20] S.J. Fairweather-Tait, R. Collings, R. Hurst, Selenium bioavailability: Current knowledge and future research requirements, *American Journal of Clinical Nutrition*. 91 (2010). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674J>.
- [21] <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>, (n.d.).
- [22] Y. Liu, S. Huang, Z. Jiang, Y. Wang, Z. Zhang, Selenium Biofortification Modulates Plant Growth, Microelement and Heavy Metal Concentrations, Selenium Uptake, and Accumulation in Black-Grained Wheat, *Frontiers in Plant Science*. 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748523>.
- [23] L. Wang, G. Sagada, R. Wang, P. Li, B. Xu, C. Zhang, J. Qiao, Y. Yan, Different forms of selenium supplementation in fish feed: The bioavailability, nutritional functions, and potential toxicity, *Aquaculture*. 549 (2022) 737819. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737819>.

- [24] L. Yuan, Z.F. Ma, M. Zhang, L. Qin, X. Yin, F. Han, Hair Se Is a Sensitive Biomarker to Monitor the Effects of Se Supplementation in Elderly, *Biological Trace Element Research*. 200 (2022) 488–496. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02674-6>.
- [25] M. Eurola, Proceedings : twenty years of selenium fertilization, September 8-9, 2005, Helsinki, Finland, in: 2005.
- [26] F.M. Fordyce, Z. Guangdi, K. Green, L. Xinping, Soil, grain and water chemistry in relation to human selenium-responsive diseases in Enshi District, China, *Applied Geochemistry*. 15 (2000) 117–132. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00035-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00035-9).
- [27] B.R. Whelan, D.W. Peter, N.J. Barrow, Selenium fertilizers for pastures grazed by sheep. 1. Selenium concentrations in whole blood and plasma, *Australian Journal of Agricultural Research*. 45 (1994) 863–875. <https://doi.org/10.1071/AR9940863>.
- [28] T.K. Gates, B.M. Cody, J.P. Donnelly, A.W. Herting, R.T. Bailey, J. Mueller Price, Assessing Selenium Contamination in the Irrigated Stream–Aquifer System of the Arkansas River, Colorado, *Journal of Environmental Quality*. 38 (2009) 2344–2356. <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/jeq2008.0499>.
- [29] J. Altansuvd, Y.M. Nakamaru, S. Kasajima, H. Ito, H. Yoshida, Effect of long-term phosphorus fertilization on soil Se and transfer of soil Se to crops in northern Japan, *Chemosphere*. 107 (2014) 7–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.056>.
- [30] Y. Pan, Y. Wang, S. Lou, M. Wanapat, Z. Wang, W. Zhu, F. Hou, Selenium supplementation improves nutrient intake and digestibility, and mitigates CH₄ emissions from sheep grazed on the mixed pasture of alfalfa and tall fescue, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 105 (2021) 611–620. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpn.13495>.
- [31] Š. Krys, E. Lokajová, A. Podhorský, L. Pavlata, Microelement supplementation in dairy cows by mineral lick, *Acta Veterinaria Brno*. 78 (2009) 29–36. <https://doi.org/10.2754/avb200978010029>.
- [32] W.C. Stewart, G. Bobe, W.R. Vorachek, G.J. Pirelli, W.D. Mosher, T. Nichols, R.J. van Saun, N.E. Forsberg, J.A. Hall, Organic and inorganic selenium: II. Transfer efficiency from ewes to lambs¹, *Journal of Animal Science*. 90 (2012) 577–584. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4076>.

- [33] K. Sołtyk, A. Łozak, P. Ostapczuk, Z. Fijałek, Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32 (2003) 425–432. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00240-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00240-1).
- [34] E.P. on A. and P. or S. used in A.F. (FEEDAP), V. Bampidis, G. Azimonti, M. de L. Bastos, H. Christensen, B. Dusemund, M. Fašmon Durjava, M. Kouba, M. López-Alonso, S. López Puente, F. Marcon, B. Mayo, A. Pechová, M. Petkova, F. Ramos, Y. Sanz, R.E. Villa, R. Woutersen, R. Brozzi, J. Galobart, L. Gregoret, M.L. Innocenti, M.V. Vettori, G. López-Gálvez, Safety and efficacy of the feed additive consisting of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060) for all animal species (Alltech Ireland), *EFSA Journal*. 19 (2021) e06979. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6979>.
- [35] V. Gómez-Jacinto, T. García-Barrera, I. Garbayo, C. Vilchez, J.L. Gómez-Ariza, Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorkiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium, *Pure and Applied Chemistry*. 84 (2012) 269–280. <https://doi.org/doi:10.1351/PAC-CON-11-09-18>.
- [36] K.M. BROWN, K. PICKARD, F. NICOL, G.J. BECKETT, G.G. DUTHIE, J.R. ARTHUR, Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes, *Clinical Science*. 98 (2000) 593–599. <https://doi.org/10.1042/cs0980593>.
- [37] M.A. Lazo-Vélez, A. Chávez-Santoscoy, S.O. Serna-Saldivar, Selenium-Enriched Breads and Their Benefits in Human Nutrition and Health as Affected by Agronomic, Milling, and Baking Factors, *Cereal Chemistry*. 92 (2015) 134–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-14-0110-RW>.
- [38] D. Kang, J. Lee, C. Wu, X. Guo, B.J. Lee, J.-S. Chun, J.-H. Kim, The role of selenium metabolism and selenoproteins in cartilage homeostasis and arthropathies, *Experimental & Molecular Medicine*. 52 (2020) 1198–1208. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0408-y>.
- [39] H.E. Ganther, Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase, *Carcinogenesis*. 20 (1999) 1657–1666. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.9.1657>.

- [40] E.C.S. Cruz, J. Susanne Becker, J. Sabine Becker, A. Sussulini, Imaging of Selenium by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) in 2-D Electrophoresis Gels and Biological Tissues, in: L. Chavatte (Ed.), *Selenoproteins: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 219–227. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7258-6_16.
- [41] J.C. Peeler, E. Weerapana, Chemical Biology Approaches to Interrogate the Selenoproteome, *Accounts of Chemical Research*. 52 (2019) 2832–2840. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00379>.
- [42] S. v Novoselov, M. Rao, N. v Onoshko, H. Zhi, G. v Kryukov, Y. Xiang, D.P. Weeks, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*, *The EMBO Journal*. 21 (2002) 3681–3693. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf372>.
- [43] B. Palenik, J. Grimwood, A. Aerts, P. Rouzé, A. Salamov, N. Putnam, C. Dupont, R. Jorgensen, E. Derelle, S. Rombauts, K. Zhou, R. Otillar, S.S. Merchant, S. Podell, T. Gaasterland, C. Napoli, K. Gendler, A. Manuell, V. Tai, O. Vallon, G. Piganeau, S. Jancek, M. Heijde, K. Jabbari, C. Bowler, M. Lohr, S. Robbens, G. Werner, I. Dubchak, G.J. Pazour, Q. Ren, I. Paulsen, C. Delwiche, J. Schmutz, D. Rokhsar, Y. de Peer, H. Moreau, I. v Grigoriev, The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (2007) 7705–7710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611046104>.
- [44] T. Obata, Y. Shiraiwa, A Novel Eukaryotic Selenoprotein in the Haptophyte Alga *Emiliania huxleyi**, *Journal of Biological Chemistry*. 280 (2005) 18462–18468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M501517200>.
- [45] M. Mariotti, G. Salinas, T. Gabaldón, V.N. Gladyshev, Use of selenocysteine, the 21st amino acid, in the fungal kingdom, *BioRxiv*. (2018). <https://doi.org/10.1101/314781>.
- [46] S.S. Rathore, H.S. Murthy, S.K. Girisha, M.S. Nithin, S. Nasren, M.A.A. Mamun, T.G. Puneeth, K. Rakesh, B.T.N. Kumar, M. Pai, Supplementation of nano - selenium in fish diet: Impact on selenium assimilation and immune-regulated selenoproteome expression in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 240 (2021) 108907. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108907>.
- [47] L. Wang, X. Zhang, L. Wu, Q. Liu, D. Zhang, J. Yin, Expression of selenoprotein genes in muscle is crucial for the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets

- p>supplemented with selenium yeast,
- Aquaculture*
- . 492 (2018) 82–90.
-
- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.054>
- .
- [48] Y. Zhang, Y. Zhou, U. Schweizer, N.E. Savaskan, D. Hua, J. Kipnis, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Comparative Analysis of Selenocysteine Machinery and Selenoproteome Gene Expression in Mouse Brain Identifies Neurons as Key Functional Sites of Selenium in Mammals*, *Journal of Biological Chemistry*. 283 (2008) 2427–2438.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M707951200>.
- [49] A. v Lobanov, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1790 (2009) 1424–1428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.014>.
- [50] M. v. Kasaikina, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1823 (2012) 1633–1642.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.018>.
- [51] I. Zwolak, H. Zaporowska, Selenium interactions and toxicity: a review, *Cell Biology and Toxicology*. 28 (2012) 31–46. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9203-9>.
- [52] E. Schoenmakers, K. Chatterjee, Human Genetic Disorders Resulting in Systemic Selenoprotein Deficiency, *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021).
<https://doi.org/10.3390/ijms222312927>.
- [53] D.L. Hatfield, U. Schweizer, P.A. Tsuji, V.N. Gladyshev, *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*, Springer International Publishing, 2016.
<https://books.google.es/books?id=IBTajwEACAAJ>.
- [54] P. Jitaru, G. Cozzi, A. Gambaro, P. Cescon, C. Barbante, Simultaneous speciation analysis of glutathione peroxidase, selenoprotein P and selenoalbumin in human serum by tandem anion exchange-affinity HPLC and on-line isotope dilution ICP-quadrupole MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391 (2008) 661–669.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2043-7>.
- [55] A.A. Tinkov, O.P. Ajsuvakova, T. Filippini, J.-C. Zhou, X.G. Lei, E.R. Gatiatulina, B. Michalke, M.G. Skalnaya, M. Vinceti, M. Aschner, A. v Skalny, Selenium and Selenoproteins in Adipose Tissue Physiology and Obesity, *Biomolecules*. 10 (2020) 658. <https://doi.org/10.3390/biom10040658>.

- [56] D.J. Hughes, T. Kunická, L. Schomburg, V. Liška, N. Swan, P. Souček, Expression of Selenoprotein Genes and Association with Selenium Status in Colorectal Adenoma and Colorectal Cancer, *Nutrients*. 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/nu10111812>.
- [57] S.M. Müller, C. Dawczynski, J. Wiest, S. Lorkowski, A.P. Kipp, T. Schwerdtle, Functional biomarkers for the selenium status in a human nutritional intervention study, *Nutrients*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12030676>.
- [58] L. Cao, L. Zhang, H. Zeng, R.T.Y. Wu, T.-L. Wu, W.-H. Cheng, Analyses of Selenotranscriptomes and Selenium Concentrations in Response to Dietary Selenium Deficiency and Age Reveal Common and Distinct Patterns by Tissue and Sex in Telomere-Dysfunctional Mice, *The Journal of Nutrition*. 147 (2017) 1858–1866. <https://doi.org/10.3945/jn.117.247775>.
- [59] J.M. Berg, L. Stryer, J.L. Tymoczko, J.M. Macarulla, *Bioquímica*, Reverté, 2007. <https://books.google.es/books?id=HRr4MNH2YssC>.
- [60] Y. Gao, J. Pagnon, H.C. Feng, N. Konstantopolous, J.B.M. Jowett, K. Walder, G.R. Collier, Secretion of the glucose-regulated selenoprotein SEPS1 from hepatoma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 356 (2007) 636–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.018>.
- [61] J. Sonet, K. Bierla, A.L. Bulteau, R. Lobinski, L. Chavatte, Comparison of analytical methods using enzymatic activity, immunoaffinity and selenium-specific mass spectrometric detection for the quantitation of glutathione peroxidase 1, *Analytica Chimica Acta*. 1011 (2018) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.068>.
- [62] Y. Takata, A.R. Kristal, R.M. Santella, I.B. King, D.J. Duggan, J.W. Lampe, M.P. Rayman, P.L. Blount, B.J. Reid, T.L. Vaughan, U. Peters, Selenium, Selenoenzymes, Oxidative Stress and Risk of Neoplastic Progression from Barrett's Esophagus: Results from Biomarkers and Genetic Variants, *PLOS ONE*. 7 (2012) e38612-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038612>.
- [63] B. Ilanbey, H.E. Yücel, C. Uçar, Ö. Kocamış, Selenoprotein P levels in patients with diabetes mellitus with complications, *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. (2021). <https://doi.org/10.1007/s13410-021-01029-0>.
- [64] O. Brodin, J. Hackler, S. Misra, S. Wendt, Q. Sun, E. Laaf, C. Stoppe, M. Björnstedt, L. Schomburg, Selenoprotein P as Biomarker of Selenium Status in Clinical Trials with Therapeutic Dosages of Selenite, *Nutrients*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12041067>.

- [65] M. Tanaka, Y. Saito, H. Misu, S. Kato, Y. Kita, Y. Takeshita, T. Kanamori, T. Nagano, M. Nakagen, T. Urabe, T. Takamura, S. Kaneko, K. Takahashi, N. Matsuyama, Development of a Sol Particle Homogeneous Immunoassay for Measuring Full-Length Selenoprotein P in Human Serum, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 30 (2016) 114–122. <https://doi.org/10.1002/jcla.21824>.
- [66] Z. Touat-Hamici, A.-L. Bulteau, J. Bianga, H. Jean-Jacques, J. Szpunar, R. Lobinski, L. Chavatte, Selenium-regulated hierarchy of human selenoproteome in cancerous and immortalized cells lines, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1862 (2018) 2493–2505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.012>.
- [67] J. Bianga, Z. Touat-Hamici, K. Bierla, S. Mounicou, J. Szpunar, L. Chavatte, R. Lobinski, Speciation analysis for trace levels of selenoproteins in cultured human cells, *Journal of Proteomics*. 108 (2014) 316–324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.025>.
- [68] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, J. Lewis, A. Johnson, *Introduccion a la Biologia Celular / Essential Cell Biology*, Editorial Medica Panamericana Sa de, 2011. https://books.google.es/books?id=Swr_tgAACAAJ.
- [69] J. Lamarche, L. Ronga, J. Szpunar, R. Lobinski, Characterization and Quantification of Selenoprotein P: Challenges to Mass Spectrometry, *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22126283>.
- [70] L. Dussubieux, M. Golitko, B. Gratuze, *Recent Advances in Laser Ablation ICP-MS for Archaeology*, Springer Berlin Heidelberg, 2016. <https://books.google.es/books?id=XYX7DAAQBAJ>.
- [71] B.T. Kurien, *Western Blotting for the Non-Expert*, Springer International Publishing, 2021. https://books.google.es/books?id=p_05EAAAQBAJ.
- [72] Y. Liu, J. Tang, Y. He, G. Jia, G. Liu, G. Tian, X. Chen, J. Cai, B. Kang, H. Zhao, Selenogenome and AMPK signal insight into the protective effect of dietary selenium on chronic heat stress-induced hepatic metabolic disorder in growing pigs, *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 12 (2021) 68. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00590-2>.
- [73] J. Cui, H. Liu, S. Xu, Selenium-deficient diet induces necroptosis in the pig brain by activating TNFR1 via mir-29a-3p ↑, *Metallomics*. 12 (2020) 1290–1301. <https://doi.org/10.1039/d0mt00032a>.

- [74] J.-H. Chu, Y.-X. Yan, P.-C. Gao, X.-W. Chen, R.-F. Fan, Response of selenoproteins gene expression profile to mercuric chloride exposure in chicken kidney, *Research in Veterinary Science*. 133 (2020) 4–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.020>.
- [75] F. Wang, X. Peng, Y. Chen, Y. Wang, M. Yang, M. Guo, Se Regulates the Contractile Ability of Uterine Smooth Muscles via Selenoprotein N, Selenoprotein T, and Selenoprotein W in Mice, *Biological Trace Element Research*. 192 (2019) 196–205. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-1647-4>.
- [76] A. Greasley, Y. Zhang, B. Wu, Y. Pei, N. Belzile, G. Yang, H₂S Protects against Cardiac Cell Hypertrophy through Regulation of Selenoproteins, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019 (2019) 6494306. <https://doi.org/10.1155/2019/6494306>.
- [77] H. Jiang, Q.-Q. Shi, L.-Y. Ge, Q.-F. Zhuang, D. Xue, H.-Y. Xu, X.-Z. He, Selenoprotein M stimulates the proliferative and metastatic capacities of renal cell carcinoma through activating the PI3K/AKT/mTOR pathway, *Cancer Medicine*. 8 (2019) 4836–4844. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cam4.2403>.
- [78] S.H. Yim, R. Tobe, A.A. Turanov, B.A. Carlson, Radioactive ⁷⁵Se Labeling and Detection of Selenoproteins, in: L. Chavatte (Ed.), *Selenoproteins: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 177–192. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7258-6_13.
- [79] J.K. Evenson, R.A. Sunde, Metabolism of Tracer ⁷⁵Se Selenium From Inorganic and Organic Selenocompounds Into Selenoproteins in Rats, and the Missing ⁷⁵Se Metabolites, *Frontiers in Nutrition*. 8 (2021). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2021.699652>.
- [80] J. Sonet, S. Mounicou, L. Chavatte, Nonradioactive Isotopic Labeling and Tracing of Selenoproteins in Cultured Cell Lines, in: L. Chavatte (Ed.), *Selenoproteins: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 193–203. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7258-6_14.
- [81] P.J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics, *Nature Protocols*. 4 (2009) 484–494. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.21>.
- [82] S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid, Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research, *PROTEOMICS*. 7 (2007) 340–350. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pmic.200600422>.

- [83] C.J. Martyniuk, S. Alvarez, B.P. Lo, J.R. Elphick, V.L. Marlatt, Hepatic Protein Expression Networks Associated with Masculinization in the Female Fathead Minnow (*Pimephales promelas*), *Journal of Proteome Research*. 11 (2012) 4147–4161. <https://doi.org/10.1021/pr3002468>.
- [84] X. Shen, B. Huo, T. Wu, C. Song, Y. Chi, iTRAQ-based proteomic analysis to identify molecular mechanisms of the selenium deficiency response in the Przewalski's gazelle, *Journal of Proteomics*. 203 (2019) 103389. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103389>.
- [85] R.N. Cole, I. Ruczinski, K. Schulze, P. Christian, S. Herbrich, L. Wu, L.R. DeVine, R.N. O'Meally, S. Shrestha, T.N. Boronina, J.D. Yager, J. Groopman, K.P. West Jr, The Plasma Proteome Identifies Expected and Novel Proteins Correlated with Micronutrient Status in Undernourished Nepalese Children, *The Journal of Nutrition*. 143 (2013) 1540–1548. <https://doi.org/10.3945/jn.113.175018>.
- [86] X. Zheng, B. Ren, H. Wang, R. Huang, J. Zhou, H. Liu, J. Tian, K. Huang, Hepatic proteomic analysis of selenoprotein F knockout mice by iTRAQ: An implication for the roles of selenoprotein F in metabolism and diseases, *Journal of Proteomics*. 215 (2020) 103653. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103653>.
- [87] P. Rodríguez-González, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 60 (2005) 151–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.01.005>.
- [88] M.A. García-Sevillano, G. Rodríguez-Moro, T. García-Barrera, F. Navarro, J.L. Gómez-Ariza, Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein, *Chemico-Biological Interactions*. 229 (2015) 82–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.001>.
- [89] S. Letsiou, Y. Lu, T. Nomikos, S. Antonopoulou, D. Panagiotakos, C. Pitsavos, C. Stefanadis, S.A. Pergantis, High-throughput quantification of selenium in individual serum proteins from a healthy human population using HPLC on-line with isotope dilution inductively coupled plasma-MS, *PROTEOMICS*. 10 (2010) 3447–3457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pmic.200900677>.
- [90] P. Jitaru, M. Prete, G. Cozzi, C. Turetta, W. Cairns, R. Seraglia, P. Traldi, P. Cescon, C. Barbante, Speciation analysis of selenoproteins in human serum by solid-phase

- extraction and affinity HPLC hyphenated to ICP-quadrupole MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 402–406. <https://doi.org/10.1039/B712693J>.
- [91] P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslin-Reimann, P. Fisicaro, A systematic approach to the accurate quantification of selenium in serum selenoalbumin by HPLC–ICP–MS, *Analytica Chimica Acta*. 657 (2010) 100–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.037>.
- [92] M.E. del C. Busto, C. Oster, S. Cuello-Nuñez, C.L. Deitrich, A. Raab, A. Konopka, W.D. Lehmann, H. Goenaga-Infante, P. Fisicaro, Accurate quantification of selenoproteins in human plasma/serum by isotope dilution ICP–MS: focus on selenoprotein P, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 31 (2016) 1904–1912. <https://doi.org/10.1039/C6JA00122J>.
- [93] D.W. Kim, Real time quantitative PCR, *Experimental & Molecular Medicine*. 33 (2001) 101–109.
- [94] W. Zhao, S. Bohleber, H. Schmidt, S. Seeher, M.T. Howard, D. Braun, S. Arndt, U. Reuter, H. Wende, C. Birchmeier, N. Fradejas-Villar, U. Schweizer, Ribosome profiling of selenoproteins in vivo reveals consequences of pathogenic Secisbp2 missense mutations, *The Journal of Biological Chemistry*. 294 (2019) 14185–14200. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009369>.
- [95] R.A. Sunde, A.M. Raines, K.M. Barnes, J.K. Evenson, Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome, *Bioscience Reports*. 29 (2009) 329–338. <https://doi.org/10.1042/BSR20080146>.
- [96] P. Castets, S. Maugey, C. Gartioux, M. Rederstorff, A. Krol, A. Lescure, S. Tajbakhsh, V. Allamand, P. Guicheney, Selenoprotein N is dynamically expressed during mouse development and detected early in muscle precursors, *BMC Developmental Biology*. 9 (2009) 46. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-46>.
- [97] H. Jiang, Q.-Q. Shi, L.-Y. Ge, Q.-F. Zhuang, D. Xue, H.-Y. Xu, X.-Z. He, Selenoprotein M stimulates the proliferative and metastatic capacities of renal cell carcinoma through activating the PI3K/AKT/mTOR pathway, *Cancer Medicine*. 8 (2019) 4836–4844. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cam4.2403>.
- [98] R., & S.H. Brigelius-Flohe, *Diversity of Selenium Functions in Health and Disease* (1st ed.), 1st ed., CRC Press, 2015.

- [99] K.; S.J.A.; F.C.M. Schwarz, Relation between selenium traces in L-cystine and protection against dietary liver necrosis, *Metabolism, Clinical and Experimental*. 8 (1959) 88–90.
- [100] J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G. Hoekstra, Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase, *Science*. 179 (1973) 588–590. <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.588>.
- [101] J.K. Wrobel, R. Power, M. Toborek, Biological activity of selenium: Revisited, *IUBMB Life*. 68 (2016) 97–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.1466>.
- [102] J. Salonen, G. Alfthan, J. Huttunen, J. Pikkarainen, P. Puska, ASSOCIATION BETWEEN CARDIOVASCULAR DEATH AND MYOCARDIAL INFARCTION AND SERUM SELENIUM IN A MATCHED-PAIR LONGITUDINAL STUDY, *The Lancet*. 320 (1982) 175–179. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91028-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91028-5).
- [103] L. Shi, Y. Yuan, Y. Xiao, P. Long, W. Li, Y. Yu, Y. Liu, K. Liu, H. Wang, L. Zhou, H. Yang, X. Li, M. He, T. Wu, Associations of plasma metal concentrations with the risks of all-cause and cardiovascular disease mortality in Chinese adults, *Environment International*. 157 (2021) 106808. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106808>.
- [104] B.K. Shimada, N. Alfulaij, L.A. Seale, The Impact of Selenium Deficiency on Cardiovascular Function, *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms221910713>.
- [105] M. Cabral, O. Kuxhaus, F. Eichelmann, J.F. Kopp, W. Alker, J. Hackler, A.P. Kipp, T. Schwerdtle, H. Haase, L. Schomburg, M.B. Schulze, Trace element profile and incidence of type 2 diabetes, cardiovascular disease and colorectal cancer: results from the EPIC-Potsdam cohort study, *European Journal of Nutrition*. 60 (2021) 3267–3278. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02494-3>.
- [106] D.E. Handy, J. Joseph, J. Loscalzo, Selenium, a Micronutrient That Modulates Cardiovascular Health via Redox Enzymology, *Nutrients*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13093238>.
- [107] J.A. Martinez, M.B. Skiba, H.-H.S. Chow, W.M. Chew, K. Saboda, P. Lance, N.A. Ellis, E.T. Jacobs, A Protective Role for Arachidonic Acid Metabolites against Advanced Colorectal Adenoma in a Phase III Trial of Selenium, *Nutrients*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13113877>.

- [108] E. Rodríguez-Tomás, G. Baiges-Gaya, H. Castañé, M. Arenas, J. Camps, J. Joven, Trace elements under the spotlight: A powerful nutritional tool in cancer, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 68 (2021) 126858. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126858>.
- [109] B.-K. Wu, Q.-H. Chen, D. Pan, B. Chang, L.-X. Sang, A novel therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma: Immunomodulatory mechanisms of selenium and/or selenoproteins on a shift towards anti-cancer, *International Immunopharmacology*. 96 (2021) 107790. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107790>.
- [110] X. Li, Y. Liu, A. Cao, C. Li, L. Wang, Q. Wu, X. Li, X. Lv, J. Zhu, H. Chun, C. Laba, X. Du, Y. Zhang, H. Yang, Crocin Improves Endothelial Mitochondrial Dysfunction via GPx1/ROS/KCa3.1 Signal Axis in Diabetes, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.651434>.
- [111] J. Köhrle, Selenium in Endocrinology—Selenoprotein-Related Diseases, Population Studies, and Epidemiological Evidence, *Endocrinology*. 162 (2021) bqaa228. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa228>.
- [112] Y.-C. Huang, T.-L. Wu, H. Zeng, W.-H. Cheng, Dietary Selenium Requirement for the Prevention of Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Middle-Aged Mice, *The Journal of Nutrition*. 151 (2021) 1894–1900. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab053>.
- [113] L.H. Duntas, Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms., *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme*. 41 (2009) 443–447. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220724>.
- [114] Z. Huang, A.H. Rose, P.R. Hoffmann, The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling*. 16 (2012) 705–743. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>.
- [115] J. Zhang, R. Saad, E.W. Taylor, M.P. Rayman, Selenium and selenoproteins in viral infection with potential relevance to COVID-19., *Redox Biology*. 37 (2020) 101715. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101715>.
- [116] A. v Skalny, P.S. Timashev, M. Aschner, J. Aaseth, L.N. Chernova, V.E. Belyaev, A.R. Grabeklis, S. v Notova, R. Lobinski, A. Tsatsakis, A.A. Svistunov, V. v Fomin, A.A. Tinkov, P. v Glybochko, Serum Zinc, Copper, and Other Biometals Are Associated with COVID-19 Severity Markers, *Metabolites*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/metabo11040244>.

- [117] W.-H. Cheng, Revisiting Selenium Toxicity, *The Journal of Nutrition*. 151 (2021) 747–748. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa433>.
- [118] J.K. MacFarquhar, D.L. Broussard, P. Melstrom, R. Hutchinson, A. Wolkin, C. Martin, R.F. Burk, J.R. Dunn, A.L. Green, R. Hammond, W. Schaffner, T.F. Jones, Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement, *Archives of Internal Medicine*. 170 (2010) 256–261. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.495>.
- [119] M.P. Rayman, Selenium intake, status, and health: a complex relationship, *Hormones*. 19 (2020) 9–14. <https://doi.org/10.1007/s42000-019-00125-5>.
- [120] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57 (2003) 134–144. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00035-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00035-0).
- [121] G. Fu, X. Chen, M. Qi, X. Du, Z. Xia, Q. Liu, N. Sun, C. Shi, R. Zhang, Status and potential diagnostic roles of essential trace elements in Kashin- Beck disease patients, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 69 (2022) 126880. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126880>.
- [122] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology, *Chemical Reviews*. 104 (2004) 6255–6286. <https://doi.org/10.1021/cr0406559>.
- [123] K. Jomova, M. Valko, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*. 283 (2011) 65–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>.
- [124] U. Tinggi, Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, *Toxicology Letters*. 137 (2003) 103–110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00384-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00384-3).
- [125] Historical Roles of Selenium and Selenoproteins in Health and Development_ The Good, the Bad and the Ugly _ Enhanced Reader, (n.d.).
- [126] U. Ahsan, Z. Kamran, I. Raza, S. Ahmad, W. Babar, M.H. Riaz, Z. Iqbal, Role of selenium in male reproduction—A review, *Animal Reproduction Science*. 146 (2014) 55–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>.
- [127] D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev, Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health, Springer New York, 2011. <https://books.google.es/books?id=jhAqhj5Jr54C>.

- [128] J. Pieczyńska, H. Grajeta, The role of selenium in human conception and pregnancy, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 29 (2015) 31–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.07.003>.
- [129] I.H. Qazi, C. Angel, H. Yang, B. Pan, E. Zoidis, C.-J. Zeng, H. Han, G.-B. Zhou, Selenium, Selenoproteins, and Female Reproduction: A Review, *Molecules (Basel, Switzerland)*. 23 (2018) 3053. <https://doi.org/10.3390/molecules23123053>.
- [130] M.J. Ceko, K. Hummitzsch, N. Hatzirodos, W.M. Bonner, J.B. Aitken, D.L. Russell, M. Lane, R.J. Rodgers, H.H. Harris, X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function†, *Metallomics*. 7 (2015) 71–82. <https://doi.org/10.1039/c4mt00228h>.
- [131] P. Hofstee, L.A. Bartho, D.R. McKeating, F. Radenkovic, G. McEnroe, J.J. Fisher, O.J. Holland, J.J. Vanderlelie, A. v Perkins, J.S.M. Cuffe, Maternal selenium deficiency during pregnancy in mice increases thyroid hormone concentrations, alters placental function and reduces fetal growth, *The Journal of Physiology*. 597 (2019) 5597–5617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1113/JP278473>.
- [132] L.H. Duntas, Selenium and at-risk pregnancy: challenges and controversies, *Thyroid Research*. 13 (2020) 16. <https://doi.org/10.1186/s13044-020-00090-x>.
- [133] D. Behne, H. Weiler, A. Kyriakopoulos, Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *Reproduction*. 106 (1996) 291–297. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060291>.
- [134] E.C. Segerson, B.H. Johnson, Selenium and Reproductive Function in Yearling Angus Bulls3, *Journal of Animal Science*. 51 (1980) 395–401. <https://doi.org/10.2527/jas1980.512395x>.
- [135] A. Ghorbani, M.M. Moeini, M. Souri, H. Hajarian, Influences of dietary selenium, zinc and their combination on semen characteristics and testosterone concentration in mature rams during breeding season, *Journal of Applied Animal Research*. 46 (2018) 813–819. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1406858>.
- [136] S. Asri-Rezaei, A. Nourian, A. Shalizar-Jalali, G. Najafi, A. Nazarizadeh, M. Koohestani, A. Karimi, Selenium supplementation in the form of selenium nanoparticles and selenite sodium improves mature male mice reproductive performances, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 21 (2018) 577–585. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.26023.6397>.

- [137] N. Kaushal, M.P. Bansal, Diminished reproductive potential of male mice in response to selenium-induced oxidative stress: Involvement of HSP70, HSP70-2, and MSJ-1, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 23 (2009) 125–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbt.20276>.
- [138] M.F.C.M. Knapen, P.L.M. Zusterzeel, W.H.M. Peters, E.A.P. Steegers, Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: A review, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 82 (1999) 171–184. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(98\)00242-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-2115(98)00242-5).
- [139] S.M. Reza, S. Shiva, Efficacy of Selenium and/or N-Acetyl-Cysteine for Improving Semen Parameters in Infertile Men: A Double-Blind, Placebo Controlled, Randomized Study, *Journal of Urology*. 181 (2009) 741–751. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.015>.
- [140] U. Fulvio, H. Sabina, K. Michael, M. Matilde, R. Antonella, W. Josef, F. Leopold, Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation, *Science*. 285 (1999) 1393–1396. <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1393>.
- [141] F. Parillo, L. Sylla, C. Palombi, M. Monaci, G. Stradaioli, Immunocytochemical Localisation of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Bull's Spermatogenic Cells, *Italian Journal of Animal Science*. 13 (2014) 3483. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3483>.
- [142] G.E. Olson, V.P. Winfrey, S.K. NagDas, K.E. Hill, R.F. Burk, Apolipoprotein E Receptor-2 (ApoER2) Mediates Selenium Uptake from Selenoprotein P by the Mouse Testis *, *Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 12290–12297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611403200>.
- [143] M.D. Griswold, 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells, *Biology of Reproduction*. 99 (2018) 87–100. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy027>.
- [144] K.E. Hill, J. Zhou, W.J. McMahan, A.K. Motley, J.F. Atkins, R.F. Gesteland, R.F. Burk, Deletion of Selenoprotein P Alters Distribution of Selenium in the Mouse*, *Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 13640–13646. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M300755200>.
- [145] A. Noblanc, A. Kocer, E. Chabory, P. Vernet, F. Saez, R. Cadet, M. Conrad, J.R. Drevet, Glutathione Peroxidases at Work on Epididymal Spermatozoa: An Example of the Dual Effect of Reactive Oxygen Species on Mammalian Male Fertilizing Ability, *Journal of*

- Andrology. 32 (2011) 641–650.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012823>.
- [146] E.G. Varlamova, S. v Novoselov, V.I. Novoselov, cDNA cloning and the expression and determination of substrate specificity of mice selenocysteine-containing protein SelV (Selenoprotein V), Molecular Biology. 49 (2015) 700–704.
<https://doi.org/10.1134/S0026893315050180>.
- [147] X. Zhang, R.-P. Liu, W.-H. Cheng, J.-H. Zhu, Prioritized brain selenium retention and selenoprotein expression: Nutritional insights into Parkinson's disease, Mechanisms of Ageing and Development. 180 (2019) 89–96.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.04.004>.
- [148] Z.-H. Zhang, C. Chen, S.-Z. Jia, X.-C. Cao, M. Liu, J. Tian, P.R. Hoffmann, H.-X. Xu, J.-Z. Ni, G.-L. Song, Selenium Restores Synaptic Deficits by Modulating NMDA Receptors and Selenoprotein K in an Alzheimer's Disease Model, Antioxidants & Redox Signaling. 35 (2020) 863–884. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7990>.
- [149] K. Raj, P. Kaur, G.D. Gupta, S. Singh, Metals associated neurodegeneration in Parkinson's disease: Insight to physiological, pathological mechanisms and management, Neuroscience Letters. 753 (2021) 135873.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135873>.
- [150] M.L. Elkjaer, A. Nawrocki, T. Kacprowski, P. Lassen, A.H. Simonsen, R. Marignier, T. Sejbaek, H.H. Nielsen, L. Wermuth, A.Y. Rashid, P. Høgh, F. Sellebjerg, R. Reynolds, J. Baumbach, M.R. Larsen, Z. Illes, CSF proteome in multiple sclerosis subtypes related to brain lesion transcriptomes, Scientific Reports. 11 (2021) 4132.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83591-5>.
- [151] N. Samad, T. Rao, M.H. ur Rehman, S.A. Bhatti, I. Imran, Inhibitory Effects of Selenium on Arsenic-Induced Anxiety-/Depression-Like Behavior and Memory Impairment, Biological Trace Element Research. 200 (2022) 689–698.
<https://doi.org/10.1007/s12011-021-02679-1>.
- [152] L. Fagerberg, B.M. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpoor, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjöstedt, E. Lundberg, C.A.-K. Szgyarto, M. Skogs, J.O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J.M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten, M. Uhlén, Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide

- Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics*, Molecular & Cellular Proteomics. 13 (2014) 397–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>.
- [153] M.T. Castex, A. Arabo, M. Bénard, V. Roy, V. le Joncour, G. Prévost, J.-J. Bonnet, Y. Anouar, A. Falluel-Morel, Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice, Molecular Neurobiology. 53 (2016) 5818–5832. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9505-7>.
- [154] S.-Q. Gao, J.-Q. Liu, Y.-L. Han, Q.-Z. Deji, W.-D. Zhaba, H.-J. Deng, X.-L. Liu, M.-L. Zhou, Neuroprotective role of glutathione peroxidase 4 in experimental subarachnoid hemorrhage models, Life Sciences. 257 (2020) 118050. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118050>.
- [155] W.S. Hambright, R.S. Fonseca, L. Chen, R. Na, Q. Ran, Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration, Redox Biology. 12 (2017) 8–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.021>.
- [156] L. Boukhzar, A. Hamieh, D. Cartier, Y. Tanguy, I. Alsharif, M. Castex, A. Arabo, S. el Hajji, J.-J. Bonnet, M. Errami, A. Falluel-Morel, A. Chagraoui, I. Lihrmann, Y. Anouar, Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson’s Disease, Antioxidants & Redox Signaling. 24 (2016) 557–574. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6478>.
- [157] Y.W. Chung, D. Jeong, O.J. Noh, Y.H. Park, S.I. Kang, M.G. Lee, T.-H. Lee, M. bin Yim, I.Y. Kim, Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death, Molecules and Cells. 27 (2009) 609–613. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0074-3>.
- [158] R.F. Burk, K.E. Hill, Regulation of Selenium Metabolism and Transport, Annual Review of Nutrition. 35 (2015) 109–134. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034250>.
- [159] M. Scharpf, U. Schweizer, T. Arzberger, W. Roggendorf, L. Schomburg, J. Köhrle, Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain, Journal of Neural Transmission. 114 (2007) 877–884. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0617-0>.
- [160] K. Renko, M. Werner, I. Renner-Müller, T.G. Cooper, C.H. Yeung, B. Hollenbach, M. Scharpf, J. Köhrle, L. Schomburg, U. Schweizer, Hepatic selenoprotein P (SePP)

- expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice, *Biochemical Journal*. 409 (2008) 741–749. <https://doi.org/10.1042/BJ20071172>.
- [161] M.M. Peters, K.E. Hill, R.F. Burk, E.J. Weeber, Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice, *Molecular Neurodegeneration*. 1 (2006) 12. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-12>.
- [162] G.A. Garden, A.R. La Spada, Intercellular (Mis)communication in Neurodegenerative Disease, *Neuron*. 73 (2012) 886–901. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.017>.
- [163] Y. Horibata, O. Elpeleg, A. Eran, Y. Hirabayashi, D. Savitzki, G. Tal, H. Mandel, H. Sugimoto, EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans[S], *Journal of Lipid Research*. 59 (2018) 1015–1026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.P081620>.
- [164] J. Soerensen, C. Jakupoglu, H. Beck, H. Förster, J. Schmidt, W. Schmahl, U. Schweizer, M. Conrad, M. Brielmeier, The Role of Thioredoxin Reductases in Brain Development, *PLOS ONE*. 3 (2008) e1813-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001813>.
- [165] J. Bernal, Thyroid hormone receptors in brain development and function, *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 3 (2007) 249–259. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0424>.
- [166] T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, M. González-Fernández, F. Moreno, M.A. García-Sevillano, V. Gómez-Jacinto, Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403 (2012) 2237–2253. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5776-2>.
- [167] Y. Chen, R.M. Santella, M.G. Kibriya, Q. Wang, M. Kappil, W.J. Verret, J.H. Graziano, H. Ahsan, Association between arsenic exposure from drinking water and plasma levels of soluble cell adhesion molecules, *Environmental Health Perspectives*. 115 (2007) 1415–1420. <https://doi.org/10.1289/ehp.10277>.
- [168] A.L. Choi, E. Budtz-Jørgensen, P.J. Jørgensen, U. Steuerwald, F. Debes, P. Weihe, P. Grandjean, Selenium as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity, *Environmental Research*. 107 (2008) 45–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.07.006>.

- [169] J.R. McConnell, R. Edwards, Coal burning leaves toxic heavy metal legacy in the Arctic, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (2008) 12140–12144. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803564105>.
- [170] A. Saravanan, P.S. Kumar, R. v Hemavathy, S. Jeevanantham, P. Harikumar, G. Priyanka, D.R.A. Devakirubai, A comprehensive review on sources, analysis and toxicity of environmental pollutants and its removal methods from water environment, *Science of The Total Environment*. 812 (2022) 152456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152456>.
- [171] T.L. Roberts, Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science, *Procedia Engineering*. 83 (2014) 52–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.09.012>.
- [172] X. Huang, S. Duan, Q. Wu, M. Yu, S. Shabala, Reducing Cadmium Accumulation in Plants: Structure-Function Relations and Tissue-Specific Operation of Transporters in the Spotlight, *Plants* (Basel, Switzerland). 9 (2020) 223. <https://doi.org/10.3390/plants9020223>.
- [173] H. Kim, H.J. Lee, J.-Y. Hwang, E.-H. Ha, H. Park, M. Ha, J.H. Kim, Y.-C. Hong, N. Chang, Blood Cadmium Concentrations of Male Cigarette Smokers Are Inversely Associated with Fruit Consumption, *The Journal of Nutrition*. 140 (2010) 1133–1138. <https://doi.org/10.3945/jn.109.120659>.
- [174] M. Nasiadek, M. Danilewicz, M. Klimczak, J. Stragierowicz, A. Kilanowicz, Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in Female Wistar Rats, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019 (2019) 6490820. <https://doi.org/10.1155/2019/6490820>.
- [175] X. Jia, H. Zhang, X. Liu, Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color, *Fish Physiology and Biochemistry*. 37 (2011) 97–103. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9416-5>.
- [176] Q.Y. Chen, T. DesMarais, M. Costa, Metals and Mechanisms of Carcinogenesis, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 59 (2019) 537–554. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021031>.
- [177] F.W. Santos, G. Zeni, J.B.T. Rocha, S.N. Weis, J.M. Fachinetto, A.M. Favero, C.W. Nogueira, Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice

- tissues, *Chemico-Biological Interactions*. 151 (2005) 159–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.01.001>.
- [178] A.A. Newairy, A.S. El-Sharaky, M.M. Badreldeen, S.M. Eweda, S.A. Sheweita, The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats, *Toxicology*. 242 (2007) 23–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.09.001>.
- [179] M.A. García-Sevillano, T. García-Barrera, F. Navarro, J.L. Gómez-Ariza, Cadmium toxicity in *Mus musculus* mice based on a metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream, *Metallomics*. 6 (2014) 672–681. <https://doi.org/10.1039/c3mt00350g>.
- [180] A.S. El-Sharaky, A.A. Newairy, M.M. Badreldeen, S.M. Eweda, S.A. Sheweita, Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats, *Toxicology*. 235 (2007) 185–193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.03.014>.
- [181] I. Messaoudi, M. Banni, L. Saïd, K. Saïd, A. Kerkeni, Involvement of selenoprotein P and GPx4 gene expression in cadmium-induced testicular pathophysiology in rat, *Chemico-Biological Interactions*. 188 (2010) 94–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.012>.
- [182] J.-L. Li, R. Gao, S. Li, J.-T. Wang, Z.-X. Tang, S.-W. Xu, Testicular toxicity induced by dietary cadmium in cocks and ameliorative effect by selenium, *BioMetals*. 23 (2010) 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9334-0>.
- [183] Y. Su, L. Li, M.U. Farooq, X. Huang, T. Zheng, Y.J. Zhang, H.H. Ei, F.H. Panhwar, Z. Tang, R. Zeng, Y. Liang, X. Ye, X. Jia, J. Zhu, Rescue effects of Se-enriched rice on physiological and biochemical characteristics in cadmium poisoning mice, *Environmental Science and Pollution Research*. 28 (2021) 20023–20033. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11854-1>.
- [184] N. Zhou, H. Long, C. Wang, Z. Zhu, L. Yu, W. Yang, X. Ren, X. Liu, Characterization of selenium-containing polysaccharide from *Spirulina platensis* and its protective role against Cd-induced toxicity, *International Journal of Biological Macromolecules*. 164 (2020) 2465–2476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.100>.
- [185] H.S.H. Abu-El-Zahab, R.Z. Hamza, M.M. Montaser, M.M. El-Mahdi, W.A. Al-Harthi, Antioxidant, antiapoptotic, antigenotoxic, and hepatic ameliorative effects of L-carnitine and selenium on cadmium-induced hepatotoxicity and alterations in liver cell

- structure in male mice, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 173 (2019) 419–428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.041>.
- [186] M. Liebsch, B. Grune, A. Seiler, D. Butzke, M. Oelgeschläger, R. Pirow, S. Adler, C. Riebeling, A. Luch, Alternatives to animal testing: current status and future perspectives, *Archives of Toxicology*. 85 (2011) 841–858. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0718-x>.
- [187] A.B. Ulrich, P.M. Pour, Cell Lines, in: S. Maloy, K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition), Academic Press, San Diego, 2001: pp. 481–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00212-6>.
- [188] A. Verma, Chapter 12 - Animal Tissue Culture: Principles and Applications, in: A.S. Verma, A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology*, Academic Press, San Diego, 2014: pp. 211–231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00012-2>.
- [189] <https://www.hepg2.com/>, (n.d.).
- [190] W. Cordier, M. Yousaf, M.J. Nell, V. Steenkamp, Underlying mechanisms of cytotoxicity in HepG2 hepatocarcinoma cells exposed to arsenic, cadmium and mercury individually and in combination, *Toxicology in Vitro*. 72 (2021) 105101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105101>.
- [191] X. Men, X. Wei, X. Zhang, X.-Y. Wang, M.-L. Chen, T. Yang, J.-H. Wang, Identification of intracellular cadmium transformation in HepG2 and MCF-7 cells, *Talanta*. 218 (2020) 121065. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121065>.
- [192] N. Sun, Q. Jia, J. Tu, H. Liu, Apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells induced by seleno-ovalbumin (Se-OVA) via mitochondrial pathway, *International Journal of Biological Macromolecules*. 192 (2021) 82–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.178>.
- [193] W. Chen, H. Cheng, L. Chen, X. Zhan, W. Xia, Synthesis, characterization, and anti-tumor properties of O-benzoylselenoglycolic chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*. 193 (2021) 491–499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.086>.
- [194] L. Peng, M. He, B. Chen, Y. Qiao, B. Hu, Metallomics Study of CdSe/ZnS Quantum Dots in HepG2 Cells, *ACS Nano*. 9 (2015) 10324–10334. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b04365>.

- [195] M.-X. Zhao, Y. Li, E.-Z. Zeng, C.-J. Wang, The Application of CdSe Quantum Dots with Multicolor Emission as Fluorescent Probes for Cell Labeling, *Chemistry – An Asian Journal*. 9 (2014) 1349–1355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/asia.201301692>.
- [196] L. Peng, M. He, B. Chen, Q. Wu, Z. Zhang, D. Pang, Y. Zhu, B. Hu, Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells, *Biomaterials*. 34 (2013) 9545–9558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.038>.
- [197] J.J. v Branca, G. Morucci, M. Maresca, B. Tenci, R. Cascella, F. Paternostro, C. Ghelardini, M. Gulisano, L. di Cesare Mannelli, A. Pacini, Selenium and zinc: Two key players against cadmium-induced neuronal toxicity, *Toxicology in Vitro*. 48 (2018) 159–169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.007>.
- [198] X. Ren, S. Wang, C. Zhang, X. Hu, L. Zhou, Y. Li, L. Xu, Selenium ameliorates cadmium-induced mouse leydig TM3 cell apoptosis via inhibiting the ROS/JNK /c-jun signaling pathway, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 192 (2020) 110266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110266>.
- [199] C. Zhang, L.-L. Wang, C.-Y. Cao, N. Li, M. Talukder, J.-L. Li, Selenium mitigates cadmium-induced crosstalk between autophagy and endoplasmic reticulum stress via regulating calcium homeostasis in avian leghorn male hepatoma (LMH) cells, *Environmental Pollution*. 265 (2020) 114613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114613>.
- [200] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*. 29 (1999) 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>.
- [201] M. Hasanuzzaman, K. Nahar, Md.M. Alam, R. Roychowdhury, M. Fujita, Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants, *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (2013) 9643–9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>.
- [202] M. Vailati-Riboni, V. Palombo, J.J. Llor, What Are Omics Sciences?, in: B.N. Ametaj (Ed.), *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 1–7. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1.

- [203] C.B. Clish, Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine, Cold Spring Harbor Molecular Case Studies. 1 (2015) a000588–a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>.
- [204] M. Holčapek, G. Liebisch, K. Ekroos, Lipidomic Analysis, Analytical Chemistry. 90 (2018) 4249–4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>.
- [205] M. Lísá, E. Cífková, M. Khalikova, M. Ovčáčíková, M. Holčapek, Lipidomic analysis of biological samples: Comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods, Journal of Chromatography A. 1525 (2017) 96–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.022>.
- [206] F. Capozzi, A. Bordoni, Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition, Genes & Nutrition. 8 (2013) 1–4. <https://doi.org/10.1007/s12263-012-0310-x>.
- [207] V. García-Cañas, C. Simó, M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, Present and Future Challenges in Food Analysis: Foodomics, Analytical Chemistry. 84 (2012) 10150–10159. <https://doi.org/10.1021/ac301680q>.
- [208] B. Mahan, R.S. Chung, D.L. Pountney, F. Moynier, S. Turner, Isotope metallomics approaches for medical research, Cellular and Molecular Life Sciences. 77 (2020) 3293–3309. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03484-0>.
- [209] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, Metallomics: the concept and methodology., Chemical Society Reviews. 38 (2009) 1119–1138. <https://doi.org/10.1039/b713633c>.
- [210] J. Szpunar, Metallomics: a new frontier in analytical chemistry., Analytical and Bioanalytical Chemistry. 378 (2004) 54–56. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2333-z>.
- [211] C. Wu, R.A. Herold, E.P. Knoshaug, B. Wang, W. Xiong, L.M.L. Laurens, Fluxomic Analysis Reveals Central Carbon Metabolism Adaptation for Diazotroph Azotobacter vinelandii Ammonium Excretion, Scientific Reports. 9 (2019) 13209. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49717-6>.
- [212] C. Wu, R.A. Herold, E.P. Knoshaug, B. Wang, W. Xiong, L.M.L. Laurens, Fluxomic Analysis Reveals Central Carbon Metabolism Adaptation for Diazotroph Azotobacter vinelandii Ammonium Excretion, Scientific Reports. 9 (2019) 13209. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49717-6>.

- [213] O. Fiehn, Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes, 2002.
- [214] K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock, Mass spectrometry-based metabolomics, *Mass Spectrometry Reviews*. 26 (2007) 51–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mas.20108>.
- [215] J. Gao, N. Zhou, Y. Wu, M. Lu, Q. Wang, C. Xia, M. Zhou, Y. Xu, Urinary metabolomic changes and microbiotic alterations in presenilin1/2 conditional double knockout mice, *Journal of Translational Medicine*. 19 (2021) 351. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03032-9>.
- [216] S. Liu, Y. Gui, M.S. Wang, L. Zhang, T. Xu, Y. Pan, K. Zhang, Y. Yu, L. Xiao, Y. Qiao, C. Bonin, G. Hargis, T. Huan, Y. Yu, J. Tao, R. Zhang, D.L. Kreutzer, Y. Zhou, X.-J. Tian, Y. Wang, H. Fu, X. An, S. Liu, D. Zhou, Serum integrative omics reveals the landscape of human diabetic kidney disease, *Molecular Metabolism*. 54 (2021) 101367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101367>.
- [217] K. Watanabe, M. Iida, S. Harada, S. Kato, K. Kuwabara, A. Kurihara, A. Takeuchi, D. Sugiyama, T. Okamura, A. Suzuki, K. Amano, A. Hirayama, M. Sugimoto, T. Soga, M. Tomita, Y. Kobayashi, K. Banno, D. Aoki, T. Takebayashi, Metabolic profiling of charged metabolites in association with menopausal status in Japanese community-dwelling midlife women: Tsuruoka Metabolomic Cohort Study, *Maturitas*. 155 (2022) 54–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2021.10.004>.
- [218] T. Zeng, W. Guo, L. Jiang, Q. Luo, Z. Shi, B. Lei, J. Zhang, Z. Cai, Integration of omics analysis and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging reveals the cadmium toxicity on female ICR mouse, *Science of The Total Environment*. 801 (2021) 149803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149803>.
- [219] J.L. Monribot-Villanueva, A. Altúzar-Molina, M. Aluja, J.A. Zamora-Briseño, J.M. Elizalde-Contreras, M. v Bautista-Valle, J. Arellano de los Santos, D.E. Sánchez-Martínez, F.J. Rivera-Reséndiz, M. Vázquez-Rosas-Landa, C. Camacho-Vázquez, J.A. Guerrero-Analco, E. Ruiz-May, Integrating proteomics and metabolomics approaches to elucidate the ripening process in white *Psidium guajava*, *Food Chemistry*. 367 (2022) 130656. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130656>.
- [220] A. Halama, Metabolomics in cell culture—A strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 564 (2014) 100–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.09.002>.

- [221] K.N. Turi, L. Romick-Rosendale, K.K. Ryckman, T. v Hartert, A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 141 (2018) 1191–1201. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.021>.
- [222] X. Zhang, X. Zhu, C. Wang, H. Zhang, Z. Cai, Non-targeted and targeted metabolomics approaches to diagnosing lung cancer and predicting patient prognosis, *Oncotarget*. 7 (2016) 63437–63448. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11521>.
- [223] A. Ribbenstedt, H. Ziarrusta, J.P. Benskin, Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods, *PLoS ONE*. 13 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>.
- [224] A.K. Kosmides, K. Kamisoglu, S.E. Calvano, S.A. Corbett, I.P. Androulakis, *Metabolomic Fingerprinting: Challenges and Opportunities*, 2013.
- [225] V. Behrends, H.D. Williams, J.G. Bundy, Metabolic Footprinting: Extracellular Metabolomic Analysis, in: A. Filloux, J.-L. Ramos (Eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2014: pp. 281–292. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_23.
- [226] W.B. Dunn, David.I. Ellis, Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 24 (2005) 285–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
- [227] A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, Modern analytical techniques in metabolomics analysis, *Analyst*. 137 (2012) 293–300. <https://doi.org/10.1039/C1AN15605E>.
- [228] W.B. Dunn, A. Erban, R.J.M. Weber, D.J. Creek, M. Brown, R. Breitling, T. Hankemeier, R. Goodacre, S. Neumann, J. Kopka, M.R. Viant, Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics, *Metabolomics*. 9 (2013) 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>.
- [229] <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/designing-a-metabolomics-study/comparison-of-nmr-and-ms/>, (n.d.).
- [230] G.A.N. Gowda, D. Djukovic, Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges, *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 1198 (2014) 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2_1.

- [231] D.C. Harris, V.B. Navarro, *Análisis químico cuantitativo*, Reverté, 2007.
https://books.google.com.ec/books?id=H-_8vZYdL70C.
- [232] J.M. Thompson, *Mass Spectrometry*, Jenny Stanford Publishing, 2017.
<https://books.google.es/books?id=ImhQDwAAQBAJ>.
- [233] A. Alonso, S. Marsal, A. Julià, *Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3 (2015) 23.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>.
- [234] E.G. Armitage, C. Barbas, *Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 87 (2014) 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.041>.
- [235] O. Fiehn, *Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling*, *Current Protocols in Molecular Biology*. 114 (2016) 30.4.1–30.4.32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>.
- [236] Y. Wang, L. Xu, H. Shen, J. Wang, W. Liu, X. Zhu, R. Wang, X. Sun, L. Liu, *Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots*, *Scientific Reports*. 5 (2015) 18296.
<https://doi.org/10.1038/srep18296>.
- [237] S.G. Villas-Bôas, S. Mas, M. Akesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, *Mass spectrometry in metabolome analysis.*, *Mass Spectrometry Reviews*. 24 (2005) 613–646.
<https://doi.org/10.1002/mas.20032>.
- [238] D.J. Beale, F.R. Pinu, K.A. Kouremenos, M.M. Poojary, V.K. Narayana, B.A. Boughton, K. Kanojia, S. Dayalan, O.A.H. Jones, D.A. Dias, *Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research*, *Metabolomics*. 14 (2018) 152.
<https://doi.org/10.1007/s11306-018-1449-2>.
- [239] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, E. de la Mora Lugo, *Fundamentos de Química Analítica*, CENGAGE Learning, 2014.
<https://books.google.es/books?id=YmdergEACAAJ>.
- [240] B. Zhou, J.F. Xiao, L. Tuli, H.W. Ransom, *LC-MS-based metabolomics*, *Molecular BioSystems*. 8 (2012) 470–481. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>.
- [241] X. Qi, X. Chen, Y. Wang, *Plant Metabolomics: Methods and Applications*, Springer Netherlands, 2014. <https://books.google.es/books?id=XsGLBQAAQBAJ>.

- [242] J.H. Gross, Mass Spectrometry: A Textbook, Springer Berlin Heidelberg, 2006. https://books.google.es/books?id=_gxsfZK8gbUC.
- [243] S. Heiles, Advanced tandem mass spectrometry in metabolomics and lipidomics—methods and applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 413 (2021) 5927–5948. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03425-1>.
- [244] A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkauer, F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407 (2015) 6593–6617. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8858-0>.
- [245] V. Balaram, T.G. Rao, Rapid determination of REEs and other trace elements in geological samples by microwave acid digestion and ICP-MS, *Atomic Spectroscopy*. 24 (2003) 206–212.
- [246] O. v Kuznetsova, O.B. Mokhodoeva, V. v Maksimova, R.Kh. Dzhenloda, M. Jarosz, V.M. Shkinev, A.R. Timerbaev, High-resolution ICP-MS approach for characterization of magnetic nanoparticles for biomedical applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 189 (2020) 113479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113479>.
- [247] T. Ohno, Y. Muramatsu, Determination of radioactive cesium isotope ratios by triple quadrupole ICP-MS and its application to rainwater following the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 347–351. <https://doi.org/10.1039/C3JA50291K>.
- [248] K.L. Nuttall, W.H. Gordon, K.O. Ash, Inductively coupled plasma mass spectrometry for trace element analysis in the clinical laboratory, *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 25 (1995) 264–271.
- [249] S.C. Wilschefschi, M.R. Baxter, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects, *The Clinical Biochemist. Reviews*. 40 (2019) 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>.
- [250] A.A. Ammann, Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *Journal of Mass Spectrometry*. 42 (2007) 419–427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.1206>.
- [251] R. Thomas, Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Third Edition, Taylor & Francis, 2013. <https://books.google.es/books?id=kHNt75Bu1hwC>.

- [252] J.W. Olesik, Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP/MS, *Analytical Chemistry*. 63 (1991) 12A-21A. <https://doi.org/10.1021/ac00001a711>.
- [253] F. Vanhaecke, H. Vanhoe, R. Dams, C. Vandecasteele, The use of internal standards in ICP-MS, *Talanta*. 39 (1992) 737–742. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0039-9140\(92\)80088-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0039-9140(92)80088-U).
- [254] W. Tittes, N. Jakubowski, D. Stüwer, G. Tölg, J.A.C. Broekaert, Reduction of some selected spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 1015–1020. <https://doi.org/10.1039/JA9940901015>.
- [255] N. Sugiyama, Y. Shikamori, Removal of spectral interferences on noble metal elements using MS/MS reaction cell mode of a triple quadrupole ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 2481–2487. <https://doi.org/10.1039/C5JA00308C>.
- [256] E. Thursby, N. Juge, Introduction to the human gut microbiota, *The Biochemical Journal*. 474 (2017) 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.
- [257] B. Wang, M. Yao, L. Lv, Z. Ling, L. Li, The Human Microbiota in Health and Disease, *Engineering*. 3 (2017) 71–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>.
- [258] A.M. Valdes, J. Walter, E. Segal, T.D. Spector, Role of the gut microbiota in nutrition and health, *BMJ (Online)*. 361 (2018) 36–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>.
- [259] Y. Fan, O. Pedersen, Gut microbiota in human metabolic health and disease, *Nature Reviews Microbiology*. 19 (2021) 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>.
- [260] M. Costa, J.S. Weese, Methods and basic concepts for microbiota assessment, *Veterinary Journal*. 249 (2019) 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.005>.
- [261] C. Milani, S. Duranti, F. Bottacini, E. Casey, F. Turrone, J. Mahony, C. Belzer, S. Delgado Palacio, S. Arbolea Montes, L. Mancabelli, G.A. Lugli, J.M. Rodriguez, L. Bode, W. de Vos, M. Gueimonde, A. Margolles, D. van Sinderen, M. Ventura, The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 81 (2017). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>.
- [262] V.T. Pham, S. Dold, A. Rehman, J.K. Bird, R.E. Steinert, Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans, *Nutrition Research*. 95 (2021) 35–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.001>.

- [263] E.P.J.G. Neis, C.H.C. Dejong, S.S. Rensen, The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism, *Nutrients*. 7 (2015) 2930–2946. <https://doi.org/10.3390/nu7042930>.
- [264] C. Chassard, C. Lacroix, Carbohydrates and the human gut microbiota, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 16 (2013). https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Fulltext/2013/07000/Carbohydrates_and_the_human_gut_microbiota.14.aspx.
- [265] L.H. Morais, H.L. Schreiber, S.K. Mazmanian, The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders, *Nature Reviews Microbiology*. 19 (2021) 241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>.
- [266] R. Krajmalnik-Brown, Z.-E. Ilhan, D.-W. Kang, J.K. DiBaise, Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation, *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 27 (2012) 201–214. <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>.
- [267] S.H. Rhee, C. Pothoulakis, E.A. Mayer, Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 6 (2009) 306–314. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.35>.
- [268] C. Tsigos, G.P. Chrousos, Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress, *Journal of Psychosomatic Research*. 53 (2002) 865–871. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4).
- [269] F. Angelucci, K. Cechova, J. Amlerova, J. Hort, Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer’s disease, *Journal of Neuroinflammation*. 16 (2019) 108. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1494-4>.
- [270] A. Keshavarzian, P. Engen, S. Bonvegna, R. Cilia, Chapter 11 - The gut microbiome in Parkinson’s disease: A culprit or a bystander?, in: A. Björklund, M.A. Cenci (Eds.), *Progress in Brain Research*, Elsevier, 2020: pp. 357–450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2020.01.004>.
- [271] A. Madison, J.K. Kiecolt-Glaser, Stress, depression, diet, and the gut microbiota: human-bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition, *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 28 (2019) 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.01.011>.

- [272] B. Yang, J. Wei, P. Ju, J. Chen, Effects of regulating intestinal microbiota on anxiety symptoms: A systematic review, *General Psychiatry*. 32 (2019) e100056–e100056. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2019-100056>.
- [273] T.W. Hodo, M.T.P. de Aquino, A. Shimamoto, A. Shanker, Critical Neurotransmitters in the Neuroimmune Network, *Frontiers in Immunology*. 11 (2020) 1869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01869>.
- [274] P. Li, Y.-L. Yin, D. Li, S. Woo Kim, G. Wu, Amino acids and immune function, *British Journal of Nutrition*. 98 (2007) 237–252. <https://doi.org/DOI:10.1017/S000711450769936X>.
- [275] R. Corrêa-Oliveira, J.L. Fachi, A. Vieira, F.T. Sato, M.A.R. Vinolo, Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids, *Clinical & Translational Immunology*. 5 (2016) e73–e73. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>.
- [276] A.P. Passaro, A.L. Lebos, Y. Yao, S.L. Stice, Immune Response in Neurological Pathology: Emerging Role of Central and Peripheral Immune Crosstalk, *Frontiers in Immunology*. 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676621>.
- [277] I. Marin, J. Kipnis, Learning and memory ... and the immune system, *Learning & Memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.). 20 (2013) 601–606. <https://doi.org/10.1101/lm.028357.112>.
- [278] S. Marvin, S.R. C, C. Maria, Influence of Brain and Behavior on the Immune System, *Science*. 191 (1976) 435–440. <https://doi.org/10.1126/science.1108202>.
- [279] K. Kawashima, H. Misawa, Y. Moriwaki, Y.X. Fujii, T. Fujii, Y. Horiuchi, T. Yamada, T. Imanaka, M. Kamekura, Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems, *Life Sciences*. 80 (2007) 2206–2209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.059>.
- [280] C.M. Thomas, T. Hong, J.P. van Pijkeren, P. Hemarajata, D. v Trinh, W. Hu, R.A. Britton, M. Kalkum, J. Versalovic, Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling, *PloS One*. 7 (2012) e31951–e31951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031951>.
- [281] E. Barrett, R.P. Ross, P.W. O'Toole, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine, *Journal of Applied Microbiology*. 113 (2012) 411–417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>.

- [282] K. Pokusaeva, C. Johnson, B. Luk, G. Uribe, Y. Fu, N. Oezguen, R.K. Matsunami, M. Lugo, A. Major, Y. Mori-Akiyama, E.B. Hollister, S.M. Dann, X.Z. Shi, D.A. Engler, T. Savidge, J. Versalovic, GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine, *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 29 (2017) e12904. <https://doi.org/10.1111/nmo.12904>.
- [283] J.M. Yano, K. Yu, G.P. Donaldson, G.G. Shastri, P. Ann, L. Ma, C.R. Nagler, R.F. Ismagilov, S.K. Mazmanian, E.Y. Hsiao, Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis, *Cell*. 161 (2015) 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>.
- [284] J.H. Cummings, H.N. Englyst, Fermentation in the human large intestine and the available substrates, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 45 (1987) 1243–1255. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.5.1243>.
- [285] S.P. M, H.M. R, P. Nicolai, M. Monia, G.C. Ann, B.-Y. Mohammad, G.J. N, G.W. S, The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis, *Science*. 341 (2013) 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>.
- [286] S.J.D. O’Keefe, Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 13 (2016) 691–706. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.165>.
- [287] W.H. Oldendorf, Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids, *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 224 (1973) 1450–1453. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1973.224.6.1450>.
- [288] G. Frost, M.L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, B. Lizarbe, S. Cerdan, L. Brody, J. Anastasovska, S. Ghourab, M. Hankir, S. Zhang, D. Carling, J.R. Swann, G. Gibson, A. Viardot, D. Morrison, E. Louise Thomas, J.D. Bell, The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism, *Nature Communications*. 5 (2014) 3611. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>.
- [289] A. v Oleskin, B.A. Shenderov, Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota, *Microbial Ecology in Health and Disease*. 27 (2016) 30971. <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30971>.
- [290] B.B. Nankova, R. Agarwal, D.F. MacFabe, E.F. la Gamma, Enteric Bacterial Metabolites Propionic and Butyric Acid Modulate Gene Expression, Including CREB-Dependent Catecholaminergic Neurotransmission, in PC12 Cells - Possible Relevance to Autism

- Spectrum Disorders, PLOS ONE. 9 (2014) e103740-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103740>.
- [291] A. Tripathi, J. Debelius, D.A. Brenner, M. Karin, R. Loomba, B. Schnabl, R. Knight, The gut–liver axis and the intersection with the microbiome, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 15 (2018) 397–411. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0011-z>.
- [292] T. Yang, E.M. Richards, C.J. Pepine, M.K. Raizada, The gut microbiota and the brain–gut–kidney axis in hypertension and chronic kidney disease, *Nature Reviews Nephrology*. 14 (2018) 442–456. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0018-2>.
- [293] Y.S. Kim, T. Unno, B.Y. Kim, M.S. Park, Sex differences in gut microbiota, *World Journal of Men’s Health*. 38 (2020) 48–60. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190009>.
- [294] C. Haro, O.A. Rangel-Zúñiga, J.F. Alcalá-Díaz, F. Gómez-Delgado, P. Pérez-Martínez, J. Delgado-Lista, G.M. Quintana-Navarro, B.B. Landa, J.A. Navas-Cortés, M. Tena-Sempere, J.C. Clemente, J. López-Miranda, F. Pérez-Jiménez, A. Camargo, Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index, *PLOS ONE*. 11 (2016) e0154090-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154090>.
- [295] S. Choi, Y.-J. Hwang, M.-J.S. ^{>1, 3} and Hana Yi ^{>1, 3*}, Difference in the Gut Microbiome between Ovariectomy-Induced Obesity and Diet-Induced Obesity, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27 (2017) 2228–2236. <https://doi.org/10.4014/jmb.1710.10001>.</sup></sup>
- [296] T. Levkovich, T. Poutahidis, C. Smillie, B.J. Varian, Y.M. Ibrahim, J.R. Lakritz, E.J. Alm, S.E. Erdman, Probiotic Bacteria Induce a ‘Glow of Health,’ *PLOS ONE*. 8 (2013) e53867-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053867>.
- [297] T. Poutahidis, A. Springer, T. Levkovich, P. Qi, B.J. Varian, J.R. Lakritz, Y.M. Ibrahim, A. Chatzigiagkos, E.J. Alm, S.E. Erdman, Probiotic Microbes Sustain Youthful Serum Testosterone Levels and Testicular Size in Aging Mice, *PLOS ONE*. 9 (2014) e84877-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084877>.
- [298] J.M. Ridlon, S. Ikegawa, J.M.P. Alves, B. Zhou, A. Kobayashi, T. Iida, K. Mitamura, G. Tanabe, M. Serrano, A. de Guzman, P. Cooper, G.A. Buck, P.B. Hylemon, *Clostridium scindens*: a human gut microbe with a high potential to convert glucocorticoids into androgens, *Journal of Lipid Research*. 54 (2013) 2437–2449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.M038869>.

- [299] S. Devendran, C. Méndez-García, J.M. Ridlon, Identification and characterization of a 20 β -HSDH from the anaerobic gut bacterium *Butyrivibrio crossii* ATCC 43058[S], *Journal of Lipid Research*. 58 (2017) 916–925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.M074914>.
- [300] S. Devendran, S.M. Mythen, J.M. Ridlon, The desA and desB genes from *Clostridium scindens* ATCC 35704 encode steroid-17,20-desmolase[S], *Journal of Lipid Research*. 59 (2018) 1005–1014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.M083949>.
- [301] H. Colldén, A. Landin, V. Wallenius, E. Elebring, L. Fändriks, M.E. Nilsson, H. Ryberg, M. Poutanen, K. Sjögren, L. Vandenput, C. Ohlsson, The gut microbiota is a major regulator of androgen metabolism in intestinal contents, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 317 (2019) E1182–E1192. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00338.2019>.
- [302] K. SHIMIZU, Y. MURANAKA, R. FUJIMURA, H. ISHIDA, S. TAZUME, T. SHIMAMURA, Normalization of Reproductive Function in Germfree Mice Following Bacterial Contamination, *Experimental Animals*. 47 (1998) 151–158. <https://doi.org/10.1538/expanim.47.151>.
- [303] K. Jomova, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C.J. Rhodes, M. Valko, Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease, *Journal of Applied Toxicology*. 31 (2011) 95–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jat.1649>.
- [304] K.K.M. Alazoumi, A. Ahmed, S.F. Alamery, A. Shamsi, B. Ahmad, A. Islam, H. Farooqi, Effect of Antioxidants on Heavy Metals Induced Conformational Alteration of Cytochrome C and Myoglobin, *Protein and Peptide Letters*. 28 (2021) 31–42.
- [305] M. Balali-Mood, K. Naseri, Z. Tahergorabi, M.R. Khazdair, M. Sadeghi, Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic, *Frontiers in Pharmacology*. 12 (2021) 227. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.643972>.
- [306] M.A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, The essential metals for humans: a brief overview, *Journal of Inorganic Biochemistry*. 195 (2019) 120–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>.
- [307] P. Chellan, P.J. Sadler, The elements of life and medicines, *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*. 373 (2015) 20140182. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0182>.

- [308] S. Lobionda, P. Sittipo, H.Y. Kwon, Y.K. Lee, The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors, *Microorganisms*. 7 (2019). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080271>.
- [309] T.R. Abrahamsson, R.Y. Wu, M.C. Jenmalm, Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period, *Pediatric Research*. 77 (2015) 214–219. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.165>.
- [310] W.-Z. Li, K. Stirling, J.-J. Yang, L. Zhang, Gut microbiota and diabetes: From correlation to causality and mechanism, *World Journal of Diabetes*. 11 (2020) 293.
- [311] G. Muscogiuri, E. Cantone, S. Cassarano, D. Tuccinardi, L. Barrea, S. Savastano, A. Colao, E. on behalf of the Obesity Programs of nutrition Research and Assessment (OPERA) group, Gut microbiota: a new path to treat obesity, *International Journal of Obesity Supplements*. 9 (2019) 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41367-019-0011-7>.
- [312] J.F. Cryan, K.J. O’Riordan, K. Sandhu, V. Peterson, T.G. Dinan, The gut microbiome in neurological disorders, *The Lancet Neurology*. 19 (2020) 179–194. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4).
- [313] Q. Yang, Q. Liang, B. Balakrishnan, D.P. Belobrajdic, Q.-J. Feng, W. Zhang, Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review, *Nutrients*. 12 (2020) 381. <https://doi.org/10.3390/nu12020381>.
- [314] S.E. Rothenberg, S. Keiser, N.J. Ajami, M.C. Wong, J. Gesell, J.F. Petrosino, A. Johs, The role of gut microbiota in fetal methylmercury exposure: Insights from a pilot study, *Toxicology Letters*. 242 (2016) 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.022>.
- [315] S.E. Rothenberg, C.L. Wagner, B. Hamidi, A. v. Alekseyenko, M. Andrea Azcarate-Peril, Longitudinal changes during pregnancy in gut microbiota and methylmercury biomarkers, and reversal of microbe-exposure correlations, *Environmental Research*. 172 (2019) 700–712. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.014>.
- [316] Y. Zhao, C. Zhou, C. Wu, X. Guo, G. Hu, Q. Wu, Z. Xu, G. Li, H. Cao, L. Li, V. Latigo, P. Liu, S. Cheng, P. Liu, Subchronic oral mercury caused intestinal injury and changed gut microbiota in mice, *Science of the Total Environment*. 721 (2020) 137639. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137639>.
- [317] X. Dong, N. Shulzhenko, J. Lemaitre, R.L. Greer, K. Peremyslova, Q. Quamruzzaman, M. Rahman, O.S.I. Hasan, S.A. Joya, M. Golam, D.C. Christiani, A. Morgun, M.L. Kile,

- Arsenic exposure and intestinal microbiota in children from Sirajdikhan, Bangladesh, PLOS ONE. 12 (2017) e0188487-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188487>.
- [318] A.G. Hoen, J.C. Madan, Z. Li, M. Coker, S.N. Lundgren, H.G. Morrison, T. Palys, B.P. Jackson, M.L. Sogin, K.L. Cottingham, M.R. Karagas, Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population, Scientific Reports. 8 (2018) 12627. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30581-9>.
- [319] J.L. Brabec, J. Wright, T. Ly, H. Tong, C.J. McClimans, V. Tokarev, R. Lamendella, S. Sherchand, D. Shrestha, S. Uprety, B. Dangol, S. Tandukar, J.B. Sherchand, S.P. Sherchan, Heliyon Arsenic disturbs the gut microbiome of individuals in a disadvantaged community in Nepal, Heliyon. 6 (2020) e03313. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03313>.
- [320] L. Kun, A.R. Phillip, S.K. Ann, G.M. E, L. Stuart, W.J. S, S.J. A, T.S. R, F.J. G, Arsenic Exposure Perturbs the Gut Microbiome and Its Metabolic Profile in Mice: An Integrated Metagenomics and Metabolomics Analysis, Environmental Health Perspectives. 122 (2014) 284–291. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307429>.
- [321] X. Li, A. Daniel, M. Ernst, M. Rykær, J. Herschend, S. Johannes, Heavy metal exposure causes changes in the metabolic health-associated gut microbiome and metabolites, Environment International. 126 (2019) 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.048>.
- [322] Y. Liu, Y. Li, Y. Xia, K. Liu, L. Ren, Y. Ji, The dysbiosis of gut microbiota caused by low-dose cadmium aggravate the injury of mice liver through increasing intestinal permeability, Microorganisms. 8 (2020). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020211>.
- [323] S. Zhang, Y. Jin, Z. Zeng, Z. Liu, Z. Fu, Subchronic Exposure of Mice to Cadmium Perturbs Their Hepatic Energy Metabolism and Gut Microbiome, Chemical Research in Toxicology. 28 (2015) 2000–2009. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00237>.
- [324] S. Eggers, N. Safdar, A.K. Sethi, G. Suen, P.E. Peppard, A.E. Kates, J.H. Skarlupka, M. Kanarek, K.M.C. Malecki, Urinary lead concentration and composition of the adult gut microbiota in a, Environment International. 133 (2019) 105122. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105122>.
- [325] J. Xia, C. Jin, Z. Pan, L. Sun, Z. Fu, Y. Jin, Science of the Total Environment Chronic exposure to low concentrations of lead induces metabolic disorder and dysbiosis of

- the gut microbiota in mice, *Science of the Total Environment*. 631–632 (2018) 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.053>.
- [326] J. Wu, X.W. Wen, C. Faulk, K. Boehnke, H. Zhang, D.C. Dolinoy, C. Xi, Perinatal Lead Exposure Alters Gut Microbiota Composition and Results in Sex-specific Bodyweight Increases in Adult Mice, *Toxicological Sciences*. 151 (2016) 324–333. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw046>.
- [327] G.T. R, Manganese and Parkinson's Disease: A Critical Review and New Findings, *Environmental Health Perspectives*. 118 (2010) 1071–1080. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901748>.
- [328] H. Wang, S. Zhang, F. Yang, R. Xin, S. Wang, D. Cui, Y. Sun, The gut microbiota confers protection in the CNS against neurodegeneration induced by manganism, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 127 (2020) 110150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110150>.
- [329] S.B. Goldhaber, Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 38 (2003) 232–242. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(02\)00020-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0273-2300(02)00020-X).
- [330] F. Zhang, W. Zheng, R. Guo, W. Yao, Effect of dietary copper level on the gut microbiota and its correlation with serum inflammatory cytokines in Sprague-Dawley rats, *Journal of Microbiology*. 55 (2017) 694–702. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6627-9>.
- [331] J. Dai, X. Yang, Y. Yuan, Y. Jia, G. Liu, N. Lin, H. Xiao, L. Zhang, J. Chen, Toxicity , gut microbiota and metabolome e ff ects after copper exposure during early life in SD rats, *Toxicology*. 433–434 (2020) 152395. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152395>.
- [332] H. Shen, J. Han, Y. Li, C. Lu, J. Zhou, Y. Li, X. Su, Different host-specific responses in thyroid function and gut microbiota modulation between diet-induced obese and normal mice given the same dose of iodine, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103 (2019) 3537–3547. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09687-1>.
- [333] H. Li, H. Che, J. Xie, X. Dong, L. Song, W. Xie, J. Sun, Supplementary selenium in the form of selenylation α -D-1,6-glucan ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis in vivo, *International Journal of Biological Macromolecules*. 195 (2022) 67–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.189>.
- [334] Q. Zhai, S. Cen, P. Li, F. Tian, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen, Effects of Dietary Selenium Supplementation on Intestinal Barrier and Immune Responses Associated with Its

- Modulation of Gut Microbiota, *Environmental Science & Technology Letters*. 5 (2018) 724–730. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00563>.
- [335] Y. Gao, Y. Xu, J. Ruan, J. Yin, Selenium affects the activity of black tea in preventing metabolic syndrome in high-fat diet-fed Sprague–Dawley rats, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100 (2020) 225–234. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10027>.
- [336] M. v. Kasaikina, M.A. Kravtsova, B.C. Lee, J. Seravalli, D.A. Peterson, J. Walter, R. Legge, A.K. Benson, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Dietary selenium affects host selenoproteome expression by influencing the gut microbiota, *The FASEB Journal*. 25 (2011) 2492–2499. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181990>.
- [337] C.H. Lv, T. Wang, N. Regmi, X. Chen, K. Huang, S.F. Liao, Effects of dietary supplementation of selenium-enriched probiotics on production performance and intestinal microbiota of weanling piglets raised under high ambient temperature, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99 (2015) 1161–1171. <https://doi.org/10.1111/jpn.12326>.
- [338] J. Hrdina, A. Banning, A. Kipp, G. Loh, M. Blaut, R. Brigelius-Flohé, The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 20 (2009) 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.06.009>.
- [339] M. Herold, S. Martínez Arbas, S. Narayanasamy, A.R. Sheik, L.A.K. Kleine-Borgmann, L.A. Lebrun, B.J. Kunath, H. Roume, I. Bessarab, R.B.H. Williams, J.D. Gillece, J.M. Schupp, P.S. Keim, C. Jäger, M.R. Hoopmann, R.L. Moritz, Y. Ye, S. Li, H. Tang, A. Heintz-Buschart, P. May, E.E.L. Muller, C.C. Laczny, P. Wilmes, Integration of time-series meta-omics data reveals how microbial ecosystems respond to disturbance, *Nature Communications*. 11 (2020) 5281. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19006-2>.
- [340] P.B. Eckburg, E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, D.A. Relman, Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science*. 308 (2005) 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>.
- [341] A. Petersson, K.J. Domig, P. Nagel, W. Zollitsch, W. Hagmüller, W. Kneifel, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-based monitoring of intestinal lactobacilli and bifidobacteria of pigs during a feeding trial, *Archives of Animal Nutrition*. 63 (2009) 112–126. <https://doi.org/10.1080/17450390902733959>.

- [342] E.G. Zoetendal, A.D. Akkermans, W.M. de Vos, Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria., *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (1998) 3854–9.
- [343] M.H. Fraher, P.W.O. Toole, E.M.M. Quigley, Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9 (2012) 312–322. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>.
- [344] M. Rajilić-Stojanović, H.G.H.J. Heilig, D. Molenaar, K. Kajander, A. Surakka, H. Smidt, W.M. de Vos, Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: Analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults, *Environmental Microbiology*. 11 (2009) 1736–1751. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01900.x>.
- [345] G. Batani, K. Bayer, J. Böge, U. Hentschel, T. Thomas, Fluorescence in situ hybridization (FISH) and cell sorting of living bacteria, *Scientific Reports*. 9 (2019) 18618. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55049-2>.
- [346] M. Hamady, R. Knight, Next-Generation DNA Sequencing/Review Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges, *Genome Research*. 19 (2009) 1141–1152. <https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>.
- [347] R. D’Amore, U.Z. Ijaz, M. Schirmer, J.G. Kenny, R. Gregory, A.C. Darby, M. Shakya, M. Podar, C. Quince, N. Hall, A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling, *BMC Genomics*. 17 (2016) 55. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9>.
- [348] H.P.J. Buermans, J.T. den Dunnen, Next generation sequencing technology: Advances and applications, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1842 (2014) 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>.
- [349] N.P. McNulty, T. Yatsunenko, A. Hsiao, J.J. Faith, B.D. Muegge, A.L. Goodman, B. Henrissat, R. Oozeer, S. Cools-Portier, G. Gobert, C. Chervaux, D. Knights, C.A. Lozupone, R. Knight, A.E. Duncan, J.R. Bain, M.J. Muehlbauer, C.B. Newgard, A.C. Heath, J.I. Gordon, The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins., *Science Translational Medicine*. 3 (2011) 106ra106. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002701>.

- [350] C.F. Maurice, H.J. Haiser, P.J. Turnbaugh, Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome, *Cell*. 152 (2013) 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.052>.
- [351] G. Tosto, C. Reitz, Chapter 6 - Use of “omics” technologies to dissect neurologic disease, in: M.J. Aminoff, F. Boller, D.F. Swaab (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, 2016: pp. 91–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00006-9>.
- [352] P.Y. Lee, S.-F. Chin, H. Neoh, R. Jamal, Metaproteomic analysis of human gut microbiota: where are we heading?, *Journal of Biomedical Science*. 24 (2017) 36. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0342-z>.

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el estudio del efecto de la suplementación con selenio en modelos celulares y animales, así como su interacción con la microbiota intestinal. Este objetivo general se estructura en los siguientes objetivos concretos:

1. Llevar a cabo un ensayo de exposición *in vitro* empleando la línea celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (CdCl_2) en combinación con selenometionina (SeMet) para evaluar el posible efecto protector del Se a través de la modulación de selenoproteínas.

2. Evaluar el impacto de la suplementación de Se en la microbiota intestinal en un ensayo con ratones *Mus musculus* convencionales y con la microbiota empobrecida con un cóctel de antibióticos mediante metataxonómica.

3. Estudiar los efectos de la suplementación de Se y la microbiota intestinal en el selenoproteoma de tejidos de cerebro y testículo de ratón, aplicando técnicas metalómicas y transcriptómicas, y establecer asociaciones entre la abundancia de la microbiota intestinal a nivel de género y las selenoproteínas en dichos tejidos. Ello permitirá profundizar en los ejes microbiota intestinal-cerebro e hipotálamo-hipófisis-gonadal.

4. Realizar un estudio metabolómico no dirigido en cerebro de ratón *Mus musculus* convencional y con microbiota empobrecida suplementados con selenio o con dieta de roedores, combinando GC-MS y UHPLC-QqQ-TOF-MS para identificar metabolitos y rutas metabólicas alteradas. Además, dada la importancia del eje microbiota intestinal-cerebro, también se establecerán asociaciones entre la abundancia de la microbiota intestinal, la abundancia de los metabolitos alterados y el selenoproteoma en cerebro.

The general objective of this PhD Thesis is the study of the effect of selenium supplementation in cellular and animal models, as well as its interaction with the intestinal microbiota. This general objective is structured into the following specific objectives:

1. Carry out an *in vitro* exposure assay using the hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) at different concentrations of cadmium chloride (CdCl_2) in combination with selenomethionine (SeMet) to evaluate the possible protective effect of Se through the modulation of selenoproteins.

2. To evaluate the impact of Se supplementation on the intestinal microbiota in an assay with conventional *Mus musculus* mice and with the microbiota depleted by an antibiotic cocktail using a metataxonomics approach.

3. To study the effects of Se supplementation and the intestinal microbiota on the selenoproteome of mouse brain and testis tissues, applying metallomic and transcriptomic techniques. In addition, will be established associations between the abundance of the intestinal microbiota at the genus level and the selenoproteins in these tissues to delve into the gut microbiota-brain and hypothalamus-pituitary-gonadal axes.

4. To perform an untargeted metabolomic study in conventional and microbiota-depleted *Mus musculus* mice brain supplemented with selenium or rodent diet, combining GC-MS and UHPLC-QqQ-TOF-MS to identify metabolites and metabolic pathways altered. In addition, given the importance of the gut microbiota-brain axis, associations will also be established between the abundance of the intestinal microbiota, the abundance of altered metabolites in the brain.

EXPERIMENTAL



1. Instrumentación Analítica

1.1 Instrumentación empleada para los cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora de CO₂ con camisa de agua Forma™ Series II (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y se trabajó en una cabina de flujo laminar vertical FLOW-LAN (Indelab, Navarra, España) (Figura 18). Para la esterilización del material se empleó un autoclave modelo Raypa Stericlav-S AES-150 (Barcelona, España). El baño termostático para calentar las disoluciones de trabajo pertenece a J.P. Selecta S.A. (Barcelona, España). La visualización de las células se ha realizado en un microscopio modelo AE2000 (Motic, Wetzlar, Alemania). La separación de las células y el medio de cultivo se ha llevado a cabo en una centrífuga Eppendorf 5702 (Hamburgo, Alemania). Las medidas de absorbancia se han realizado en un espectrofotómetro UV-Vis Helios Gamma (Thermo Scientific).

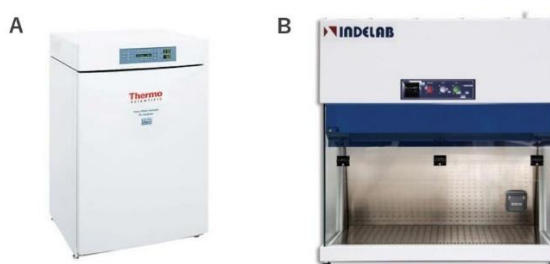


Figura 18 (A) Incubadora de CO₂ con camisa de agua Forma™ Series II (Thermo Scientific).
(B) una cabina de flujo laminar vertical FLOW-LAN (Indelab)

1.2 Instrumentación empleada para el análisis de metales traza

La determinación de los metales traza totales en las muestras se realizó previa digestión ácida asistida por un microondas MARS 6 (CEM Corporation, Carolina del Norte, Estados Unidos) en recipientes de teflón Xpress (Figura 19). El contenido total se ha determinado con un sistema ICP-MS de triple cuadrupolo (ICP-QqQ-MS) modelo 8800 (Agilent Technologies, Tokio, Japón) cuya configuración en tándem permite un control de las interferencias espectrales y ofrece una mayor precisión en los resultados, especialmente en

matrices de muestras complejas. La introducción de la muestra se realizó con la ayuda de un automuestreador SPS 4 (Agilent Technologies).



Figura 19. Sistema de digestión de microondas MARS 6 (CEM Corporation)

1.3 Instrumentación empleada para la especiación de selenoproteínas

La extracción de las selenoproteínas de las muestras se llevó a cabo con la ayuda de un homogenizador vidrio-teflón. La separación de las selenoproteínas se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficacia modelo 1260 Infinity equipado con un desgasificador, bomba binaria y automuestreador acoplado a un sistema ICP-MS de triple cuadrupolo (ICP-QqQ-MS) modelo 8800 (Agilent Technologies) (Figura 20).



Figura 20. Agilent 8800 Triple Quad equipado con un sistema de cromatografía líquida 1260 Infinity LC (Agilent Technologies)

1.4 Instrumentación empleada para los estudios metabolómicos

Las muestras para el análisis metabolómico se homogenizaron en un TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Alemania). La obtención del sobrenadante se realizó en una centrífuga modelo 5810 R equipada con un rotor F-34-6-38 (Eppendorf). Las muestras se llevaron a sequedad en un sistema de vacío Savant SpeedVac (Thermo Scientific). El estudio metabolómico se realizó empleando dos plataformas analíticas diferentes para cubrir un mayor rango de metabolitos. El análisis mediante cromatografía de gases espectrometría de

masas (GC-MS) se llevó a cabo en un Trace GC Ultra con detector de trampa de iones ITQ 900 (Thermo Scientific). Para el análisis mediante UHPLC-QTOF-MS, las muestras se analizaron en un sistema de cromatografía líquida 1290 Infinity UHPLC equipado con un desgasificador, dos bombas binarias y un automuestreador termostático y acoplado a un detector Agilent 6550 iFunnel QTOF MS (Agilent Technologies).



Figura 21. (A) Trace GC Ultra ITQ 900 (Thermo Scientific). (B) 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies)

1.5 Instrumentación empleada para los estudios de la microbiota

Los análisis de metagómica para caracterizar la microbiota intestinal de ratones expuestos se realizaron utilizando la instrumentación del IATA-CSIC (servicio de secuenciación de FISABIO-GVA). La concentración de DNA se midió con un fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technology, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La verificación de los amplicones se realizaron con un chip Bioanalyzer DNA 1000 proporcionado por Agilent Technologies.

1.6 Instrumentación empleada para el análisis de transcritos

Los análisis de transcriptómica se llevaron a cabo por el grupo de investigación de “Biología Molecular de los Mecanismos de Respuesta a Estrés- BIO-187” de la Universidad de Córdoba. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente con un sistema Beckman Coulter DU-800 UV equipado con un Hellma®Traycell (Beckman Coulter, Pasadena, CA, Estados Unidos) y su integridad con un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Los ensayos de qRT-PCR se realizaron en un SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

1.7 Instrumentación empleada para la evaluación histopatológica

Las secciones seriadas de parafina se realizaron en un micrótopo rotatorio SAKURA Accu-Cut® SRM™ 119 200. Las fotomicrografías se tomaron en un fotomicroscopio Nikon Eclipse E400.

2. Reactivos y disoluciones

El agua ultrapura (18.2 MΩ) empleada para preparar las disoluciones acuosas se obtuvo mediante un sistema MilliQ- Gradient de Millipore (Burlington, MA, Estados Unidos).

2.1 Reactivos y disoluciones de los cultivos celulares

El medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suero fetal bovino (FBS), aminoácidos no esenciales (NEAA), penicilina-estreptomicina, tripsina y buffer fosfato salino (PBS) fueron suministrados por Gibco Life Technologies (Grand Island, NY).

Los reactivos para la exposición a células HepG2, cloruro de cadmio (CdCl_2) y selenometionina (SeMet), así como 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), cloruro de sodio (NaCl), tampón HEPES, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), glicerol, Tritón X-100 fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Por último, el dodecilsulfato sódico fue adquirido en Fisher Scientific Co (Nepean, Ontario, Canada).

2.2 Reactivos y disoluciones para el análisis de metales traza

Los reactivos para la digestión ácida de las muestras ácido nítrico (HNO_3) y ácido clorhídrico (HCl) fueron adquiridos en Fisher Scientific. La disolución comercial de Rh empleada como patrón interno fue suministrada por Sigma-Aldrich.

La disolución de sintonía del ICP-QQ-MS (Li, Y, Tl y Ce en 2% HNO_3) y la disolución multipatrón 2A para la preparación de las curvas de calibrado fueron suministradas por Agilent Technologies (Tokio, Japan). Los gases utilizados (argón, helio, oxígeno e hidrógeno)

fueron de la más alta calidad comercial suministrados por Air Liquid España, S.A (Madrid, España).

La validación del método de análisis de metales en muestras de células HepG2 se llevó a cabo con el uso del material de referencia de proteína celular BCR-274 (Sigma-Aldrich). En el caso de las muestras de tejido se empleó el material de referencia de proteína de pescado DORM-4 (LGC Standards, Teddington, Reino Unido).

2.3 Reactivos y disoluciones para la especiación de selenoproteínas

El acetato de amonio utilizado para preparar las fases móviles de la especiación de selenoproteínas, el reactivo comercial de extracción de selenoproteínas CellLytic™ MT y el cocktail inhibidor de proteasas fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Las columnas HiTrap® Desalting, heparine-sepharose (HEP-HP) y blue-sepharose (BLUE-HP) fueron adquiridas en GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

Para el análisis de dilución isotópica se empleó el patrón enriquecido Se^{74} proporcionado por Cambridge Isotopes Laboratories (Massachusetts, Estados Unidos). La validación de la metodología se llevó a cabo con el material de referencia de suero humano BCR-637 (Sigma-Aldrich).

2.4 Reactivos y disoluciones para los estudios metabolómicos

Para los estudios metabolómicos, todos los disolventes (metanol, metil *tert*-butil éter (MTBE) e isopropanol) fueron de calidad óptima para espectrometría de masas y adquiridos en Fisher Scientific. Los agentes derivatizantes clorhidrato de metoxiamina, piridina y N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) y el formiato de amonio fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

La columna capilar VF-5MS empleada para el análisis mediante GC-MS, así como las columnas y pre-columnas Poroshell 120 EC-C8 fueron suministradas por Agilent Technologies.

La disolución de calibración multi-compuesto para el UHPLC-QTOF-MS y el kit comercial de masas de referencia se adquirieron en Agilent Technologies.

2.5 Reactivos y disoluciones en estudios de la microbiota

El DNA de las muestras fecales del colon se extrajo con el kit de extracción de DNA Master-Pure (Epicenter, Madison, WI, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la etapa de multiplexación se empleó el kit NextEra Index (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos).

2.6 Reactivos y disoluciones para el análisis de transcritos

El RNA de las muestras de cerebro se extrajo con el kit de extracción AllPrep® DNA/RNA/Protein Kit (QIAGEN). El cDNA se sintetizó usando el kit the iScript™ cDNA Synthesis Kit de Bio-Rad.

2.7 Reactivos y disoluciones para la evaluación histopatológica

La disolución de formalina tamponada neutra al 10% y el reactivo de tinción hematoxilina-eosina fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

3. Estudios *in vitro* para evaluar el efecto protector de la SeMet sobre CdCl₂

3.1 Preparación de las disoluciones

Las disoluciones estándar de CdCl₂ y SeMet se prepararon en agua des-ionizada empleando un sistema Milli-Q a una concentración final de 10 mM Cd y 10 mM Se y se esterilizó haciéndola pasar a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0.22 µm. Esta disolución se mantuvo en oscuridad a 4°C para posteriormente preparar disoluciones de trabajo en medio de cultivo fresco de menor concentración.

3.2 Mantenimiento de los cultivos

Para los ensayos de exposición *in vitro* se empleó la línea celular humana de hepatocarcinoma HepG2. La línea HepG2 fue adquirida de la European Collection of Cell

Cultures (ECACC) y cultivadas en frascos de 75 cm² con medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% penicilina-estreptomicina.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 95% de humedad relativa y un flujo de CO₂ del 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2 días y una vez alcanzada una confluencia de la monocapa celular del 80% (Figura 22), se realizó el pase adicionando una disolución de tripsina TrypLE Express (Gibco Life Technologies).



Figura 22. Fotomicrografía de células control HepG2 tomadas con un microscopio Motic AE2000 (10X)

3.3 Conteo celular

El número de células se determinó mediante el conteo de éstas en una cámara de recuento Neubauer (Figura 23) con la ayuda de un microscopio óptico. A una alícuota de 50 µL de la solución que contiene las células se le añadieron 50 µL del colorante azul tripán. Las células vivas no se colorean ya que mantienen su membrana celular intacta y por tanto, el azul tripán no se incorpora. El número de células se calculó utilizando la expresión matemática:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células} = \frac{a + b + c + d}{4} \cdot \text{FD} \cdot 10 \cdot 1000$$

En la que 'a', 'b', 'c' y 'd' corresponde al número de células vivas en cada área del cuadrante (Fig.X) y 'FD' al factor de dilución, en nuestro caso se empleó un FD=2.

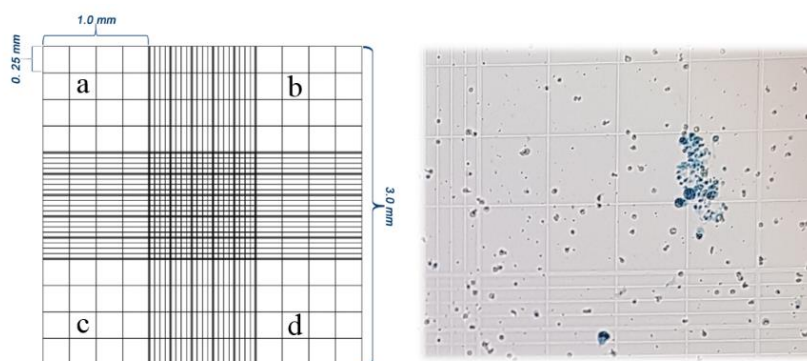


Figura 23. Visión microscópica de la cámara de Neubauer donde se pueden observar los 4 cuadrantes para el conteo celular (izquierda) y detalle de células HepG2 teñidas con azul tripán (derecha)

3.4 Ensayos de viabilidad celular

Previo a los ensayos de exposición a CdCl_2 y SeMet, se evaluó el efecto de estas especies sobre la viabilidad en la línea celular HepG2, con el fin de establecer las condiciones del estudio. Para evaluar la viabilidad celular se empleó el método colorimétrico del MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en formazan gracias a la acción de enzimas oxidoreductasa dependientes de NAD(P)H. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo que al reducirse en las células vivas y convertirse en formazan se vuelve de color violeta. Las muestras con una mayor actividad metabólica tendrán una coloración más intensa (Figura 24).

Las células HepG2 se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/ cm^2 en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24h bajo las mismas condiciones de cultivo. Tras un ciclo de crecimiento, las células fueron expuestas durante 24h a concentraciones crecientes de Cd y Se en un rango de 0-100 μM . Pasado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 400 μl de una disolución de MTT ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y se mantuvieron las células durante 3h a 37°C en atmósfera del 5% de CO_2 . Tras la reducción del MTT, la disolución sobrante se descartó y el producto de reacción formado, formazan, se solubilizó con una disolución al 10% (p/v) de dodecilsulfato sódico (SDS). Finalmente, se midió la absorbancia

(Abs) a una longitud de onda de 540 nm. La viabilidad celular es expresada como porcentaje relativo a muestras control empleando la ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Abs}_{\text{células expuestas}}}{\text{Abs}_{\text{células control}}} \cdot 100$$

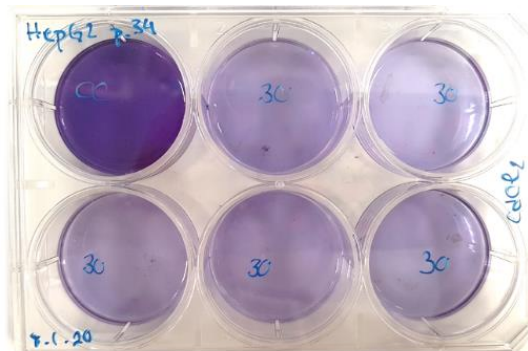


Figura 24. Aparición del formazan en células HepG2 expuestas a 30 μM Cd empleando la metodología descrita. Las muestras control con mayor viabilidad se encuentra en el pocillo de la zona superior izquierda

3.5 Ensayo de exposición a CdCl_2 y SeMet

Para determinar las interacciones de Cd y Se en modelos *in vitro*, las células HepG2 fueron expuestas durante 24 h a 100 μM Se, sólo o en combinación con diferentes concentraciones de Cd según su citotoxicidad, estableciéndose los siguientes grupos de estudio:

- Grupo control: 0 μM Cd + 0 μM Se
- Grupo Se: 100 μM Se
- Grupo Cd5: concentración no citotóxica de 5 μM Cd
- Grupo Cd5+Se: 5 μM Cd + 100 μM Se
- Grupo Cd15: media citotoxicidad 15 μM Cd
- Grupo Cd15+Se: 15 μM Cd + 100 μM Se
- Grupo Cd25: alta citotoxicidad 25 μM Cd
- Grupo Cd25+Se: 25 μM Cd + 100 μM Se

Al final del experimento, las células se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) y se recogieron mediante recolección mecánica usando un raspador celular para garantizar la integridad de las células y evitar las interferencias químicas con otros reactivos.

3.6 Determinación del contenido total de Cd y Se en células y medios de cultivo

La preparación de muestras para el análisis mediante ICP-QqQ-MS requiere de una etapa de lisis combinada con una digestión ácida que proporcione la descomposición de la materia orgánica. Las células recolectadas se homogenizaron con una disolución buffer que contiene 150 mM de NaCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 0.5% (v/v) Triton X-100 y 1% (p/v) dodecilsulfato sódico. A continuación, un volumen de 100 μL células homogenizadas se sometieron a una digestión ácida adicionando 490 μL de HNO_3 y 10 μL de HCl en un sistema MARS 6. La mineralización se llevó a cabo bajo las condiciones de la Tabla 13.

Etapa	Potencia (W)	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
1	0-200	30	25-180
2	200	10	180
3	200-400	20	180
4	400	20	18

Tabla 13. Parámetros usados para la digestión ácida asistida por microondas de las muestras de células.

Tras la digestión, las muestras de células fueron 5 veces diluidas con una disolución que contenía 5% HNO_3 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Rh (patrón interno) y filtradas a través de filtros de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0.45 μm .

La preparación de las muestras de medio de cultivo consistió en una dilución de 1 mL de muestra con una disolución que contenía 5% HNO_3 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Rh (patrón interno) y filtradas a través de filtros de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0.45 μm .

El contenido total de Cd y Se en las células expuestas y los medios de cultivo se analizó mediante plasma de acoplamiento inductivo – espectrometría de masas (ICP-QqQ-MS) cuyas condiciones operacionales están recogidas en la Tabla 14. La validación de la metodología se realizó con el material de referencia certificado de proteína celular BCR-274.

Condiciones operacionales ICP-QqQ-MS	
Nivel de potencia	1550 W
Nebulizador	MicroMist
Flujo gas de plasma	15 L·min ⁻¹
Flujo gas portador	1.08 L·min ⁻¹
Gases de reacción	40% O ₂ , H ₂
Conos	Ni
Profundidad de muestreo	10 mm
Isótopos monitorizados	⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se ¹⁰³ Rh, ¹¹¹ Cd
Tiempo de integración	0.3 s

Tabla 14. Condiciones instrumentales usadas para el análisis de metales en células HepG2 mediante ICP-QqQ-MS.

La concentración de Cd y Se en las células se calculó aplicando la siguiente ecuación propuesta por Rusanov et al. [1]:

$$C_{cél} = \frac{C_E \cdot V_{sol} \cdot F}{N_{cél} \cdot A_r(E) \cdot V_{cél}}$$

Donde C_E es la concentración del elemento a analizar en disolución, V_{sol}-volumen de la disolución, F-factor de dilución, N_{cél}- número de células, A_r(E)- peso atómico del elemento, V_{cél} – media del volumen de la célula (V= 4/3 πR³, donde R es el radio de la célula de aproximadamente 10 μm).

3.7 Especiación de selenoproteínas en células HepG2

La extracción de las proteínas celulares requiere una alta eficiencia en el lisado celular y solubilización de las proteínas, evitando al mismo tiempo que éstas se degraden e interfieran con la inmunorreactividad y actividad biológica de las proteínas. Para ello, se empleó el reactivo de extracción CellLytic™ MT, que contiene un detergente dializable suave, bicina y NaCl y al que se le adicionó un cocktail inhibidor de proteasas.

Tras la exposición a Cd y Se, el medio de cultivo se descartó y las células se lavaron con PBS y finalmente se recolectaron por recolección mecánica. Las células fueron lisadas con un volumen de reactivo CellLytic™ MT apropiado al número de células (100 μ L de reactivo por cada $15 \cdot 10^6$ células) en un agitador durante 15 min. Las células lisadas se centrifugaron a 15500 g durante 15 min a 4°C para obtener el sobrenadante que contendrá las selenoproteínas.

La separación cromatográfica de las selenoproteínas glutatión peroxidasa (GPx), selenoproteína P (SELENOP) y selenoalbúmina (SeAlb) se llevó a cabo usando un método de *'column switching'* que permite la separación simultánea de selenoproteínas y selenometabolitos. La separación se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) modelo 1260 Infinity (Agilent Technologies) y consistió en dos columnas de exclusión de tamaño (SEC) de 5 mL HiTrap® Desalting conectadas en serie con las columnas de afinidad (AF) de 1 mL heparine-sepharose (HEP-HP) y una columna de 1 mL blue-sepharose (BLUE-HP). La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) permite separar los compuestos de baja y alta masa molecular. La SELENOP es capaz de ser retenida selectivamente en las columnas HEP-HP y BLUE-HP, mientras que la SeAlb sólo presenta afinidad por BLUE-HP.

La cuantificación absoluta de las diferentes selenoproteínas se determinó mediante dilución isotópica de especies inespecíficas (SUID) en un ICP-QqQ-MS modelo 8800 (Agilent Technologies) introduciendo de forma directa el isótopo ^{74}Se a través de un conector T.

EXPERIMENTAL

Un volumen de 100 μL se inyectó en el sistema empleando como fase móvil A y B una disolución de 0.05 M y 1.5 M respectivamente de acetato de amonio a un flujo de $1.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En la posición 1 de la válvula (Figura 25), la fase móvil A fluye durante 12 min, eluyendo la GPx y los selenometabolitos. A continuación, se bombeó la fase móvil B en la posición 2 (Figura 25) para la elución de la SELENOP. Por último, y con la fase móvil B, se vuelve a la posición A para la elución de la SeAlb. Las condiciones operacionales y cromatográficas se resumen en la Tabla 15.

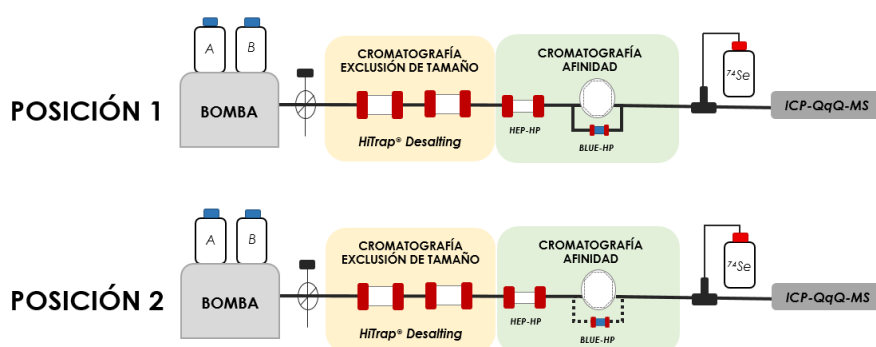


Figura 25. Diagrama esquemático del análisis para la especiación de selenoproteínas en muestras de células HepG2 basado en 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS.

Condiciones operacionales ICP-QqQ-MS		Condiciones cromatográficas	
Nivel de potencia	1550 W	Flujo	$1.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Nebulizador	MicroMist	Fase móvil A	0.05 M acetato amonio
Flujo gas de plasma	$15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	Fase móvil B	1.5 M acetato amonio
Flujo gas portador	$1.08 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$		0-12 min 0% B
Gases de reacción	40% O_2 , H_2	Gradiente	12-25 min 100% B
Conos	Ni		25-40 min 0% B
Profundidad de muestreo	10 mm	Posición válvula	Posición 1 (0-20 min)
Isótopos monitorizados	^{78}Se , ^{80}Se , ^{103}Rh , ^{111}Cd		Posición 2 (20-24 min)
Tiempo de integración	0.3 s		Posición 1 (24-40 min)

Tabla 15. Condiciones operacionales y cromatográficas análisis para la especiación de selenoproteínas en muestras de células HepG2 basado en 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS

3.8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se realizaron empleando los softwares MiniTab16 y STATISTICA 8. Se aplicó un test de normalidad Anderson-Darling para determinar si los datos seguían una distribución normal. La diferencia entre grupos de estudio se realizó aplicando los test de Kruskal-Wallis (distribuciones no paramétricas) y análisis de la varianza ANOVA (distribuciones paramétricas), considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

4. Estudios *in vivo* para evaluar los efectos de la suplementación de selenio en las selenoproteínas y perfil metabólico. Influencia de la microbiota intestinal.

4.1 Diseño experimental animal

Todos los procedimientos *in vivo* se llevaron a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (SAEX-UCO) y fueron aprobados por el comité bioético de la Universidad y el Gobierno Regional (Código nº: 02-01-2019-001).

Para los estudios del efecto de una dieta suplementada en Se, así como la influencia de la microbiota intestinal, se emplearon un total de 40 ratones macho *Mus musculus* BALB/c de 8 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en jaulas para experimentación animal con ciclos de luz/oscuridad cada 12h, a una temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de entre el 40-70% y se les proporcionó una dieta estándar y agua *ad libitum*.

Tras un periodo de aclimatación de tres días, los ratones fueron aleatoriamente divididos en dos grupos, uno que recibió agua y el otro, que recibió agua con una mezcla de antibióticos (1% ampicilina, 1% metronidazol, 1% neomicina y 1% vancomicina) y antifúngico (anfotericina B, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) durante una semana. Tras este periodo de pretratamiento, la mitad de los ratones de cada grupo ($n=10$) fueron alimentados durante dos semanas más (periodo de tratamiento) con la misma dieta estándar, y la otra mitad con una dieta enriquecida en Se ($0.65 \text{ mg/kg Na}_2\text{SeO}_3$). La Figura 26 esquematiza el diseño experimental animal. Al final del

experimento, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados por dislocación cervical. Los órganos hígado, riñón, testículos y cerebro fueron diseccionados y se recogió el contenido del ciego y colon. Todas las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis.



Figura 26. Diseño experimental animal para el estudio de la suplementación de Se y la influencia de la microbiota. Abx: antibióticos

4.2 Evaluación histopatológica de tejido testicular

El examen de las anomalías en los tejidos de testículos de ratón se realizó mediante un análisis histopatológico. Las muestras de tejido se fijaron previamente en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas y luego se embebieron en cera de parafina. Las secciones seriadas de parafina de cuatro micrómetros de espesor se obtuvieron utilizando un micrótopo rotatorio (SAKURA Accu-Cut® SRM™ 119 200) y se tiñeron con hematoxilina-eosina de acuerdo con los protocolos de rutina. Las fotomicrografías se obtuvieron con un fotomicroscopio. Las fotomicrografías se tomaron un Nikon Eclipse E400 a 400 aumentos. Se evaluaron cinco secciones diferentes de cada muestra de testículo.

4.3 Análisis de la microbiota intestinal

Los análisis de metagenómica de las muestras fecales del colon para caracterizar la microbiota intestinal de ratones expuestos se realizaron utilizando la instrumentación del IATA-CSIC en el servicio de secuenciación de FISABIO-GVA. Brevemente, el DNA de

muestras fecales (aproximadamente 100 mg) se extrajo con el kit de extracción de DNA Master-Pure siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. La concentración de DNA se midió con un fluorómetro Qubit® 2.0. El amplicón de ARNr 16S específico (región variable V3-V4 del gen de ARNr 16S) se amplificó y secuenció siguiendo los protocolos de Illumina. Se llevó a cabo un paso de multiplexación con el kit NextEra Index y se verificaron los amplicones con un chip Bioanalyzer DNA 1000. Las bibliotecas se secuenciaron (ensayo de extremo emparejado de 2x300 pb, kit de reactivos MiSeq v3) en una plataforma MiSeq-Illumina.

El procedimiento DADA2 se utilizó para lograr un filtrado de calidad, unión de secuencias y eliminación de quimeras. La asignación de taxonomía se realizó utilizando la base de datos Silva v132. Por último, las muestras con menos de 1000 lecturas, así como los taxones específicos presentes en menos del 0.01% y los presentes en menos de 3 veces en al menos el 20% de las muestras, se filtraron y eliminaron del análisis. Además, las secuencias clasificadas como Cloroplasto y Cianobacterias se filtraron del conjunto de datos final ya que están asociadas con contaminantes potenciales.

4.4 Determinación del contenido de metales traza en tejidos

El análisis del contenido total de metales traza en muestras de tejido se llevó a cabo en un sistema ICP-QqQ-MS 8800. Para ello, se preparó un *pool* de los tejidos correspondientes a cada grupo, y aproximadamente 0.1 g de muestra se mineralizó en un sistema de reacción por microondas MARS 6 con una mezcla de $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{O}_2$ en una proporción 4:1 (v/v) en vasos de teflón Xpress. Las condiciones de digestión consistieron en una rampa de temperatura desde temperatura ambiente a 160°C en 15 min a una potencia de 400W. Una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo durante 40 min. Finalizado el proceso de digestión, las muestras fueron 5 veces diluidas con una disolución que contiene 5% HNO_3 y 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ de Rh (patrón interno) y filtradas mediante filtros de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0.45 μm .

El sistema ICP-QqQ-MS estaba equipado con un nebulizador MicroMist y conos de muestreo y skimmer de Ni. Como gases de reacción se empleó un 40% de O₂ e H₂. Se monitorizaron los isótopos ²⁷Al, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁹Co, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ⁷⁵As, ⁷⁴Se, ⁷⁸Se, ⁸⁰Se ⁹⁵Mo, ¹⁰³Rh, ¹¹¹Cd, ¹²¹Sb, ²⁰⁵Tl y ²⁰⁸Pb. La validación de la metodología se realizó usando el material de referencia certificado de proteína de pescado DORM-4.

4.5 Selenoproteínas

4.5.1 Especiación de selenoproteínas mediante 2D-SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-MS

La separación cromatográfica de las selenoproteínas glutatión peroxidasa (GPx), selenoproteína P (SELENOP) y selenoalbúmina (SeAlb) en muestras de tejidos se llevó a cabo aplicando la metodología descrita en el apartado 3.7 con algunas modificaciones en la preparación de las muestras.

La extracción de las selenoproteínas de muestras de tejido (cerebro y testículos) se realizó empleando el reactivo CelLytic™ MT (3 mL·g⁻¹) con la ayuda de un homogeneizador vidrio-teflón a una temperatura de 4°C. El tejido homogéneo se centrifugó a 15500 *g* durante 20 min a 4°C para obtener el sobrenadante y éste se filtró a través de filtros de baja absorción de proteínas Iso-Disc PVDF (25 mm diámetro, 0.45 µm tamaño poro) para su análisis mediante 2D-SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-MS. En el caso de los extractos de cerebro se llevaron a sequedad con una corriente de nitrógeno como etapa de preconcentración. El extracto seco se re-disolvió en 0.1 mL de agua MilliQ antes de su análisis.

4.5.2 Expresión de selenoproteínas mediante qRT-PCR

El RNA total fue aislado a partir de 20 mg de muestra de cerebro congelado de cada ratón y de cada grupo experimental, empleando el kit AllPrep® DNA/RNA/Protein, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de las muestras de RNA se determinó espectrofotométricamente Beckman Coulter DU-800 UV equipado con un Hellma®Traycell) y su integridad se analizó empleando un Agilent 2100 Bioanalyzer. Sólo las

muestras de RNA puras (ratios A260/A280 $\approx$ 2.0), integrales (RNA número de integridad, RINs, $\geq$ 8.5) y libres de gDNA se usaron para los análisis de transcritos.

El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA total usando el kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad), siguiendo el protocolo del fabricante. Los ensayos de PCR a tiempo real (qRT-PCR) se llevaron a cabo por cuadruplicado usando ng de cDNA en 20 μ L de volumen final de reacción, pares de primers específicos y SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Todos los targets amplificados tuvieron una eficiencia similar (100%) y alta linealidad ($r > 0.99$). Se preparó una curva de calibración absoluta para relacionar la señal de PCR con el número de copias de mRNA y el número de moléculas de transcritos estimadas a partir de la regresión lineal de la curva de calibrado.

4.6 Análisis metabolómico no dirigido de muestras de cerebro

4.6.1 Tratamiento de muestras

Previo a la extracción de los metabolitos, los tejidos de cerebro fueron pulverizados con la ayuda de nitrógeno líquido en un mortero. La extracción de los metabolitos se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Fernández-García et al. 2019 [2] con algunas modificaciones. Una cantidad de aproximadamente 30 mg de tejidos de cerebro fueron homogenizados durante 15 min en un homogeneizador TissueLyser LT junto con 0.3 mL de una mezcla fría (-20°C) de metanol/agua (1:1, v/v) y microesferas de vidrio de 1 mm de diámetro. A continuación, a una alícuota de 0.1 mL de la mezcla homogénea se le adicionó 0.4 mL de una mezcla de metanol/metil *tert*-butil éter (MTBE) y se mantuvo en agitación vórtex durante 1h. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4000 *g* durante 20 min a 20°C para obtener el sobrenadante. Éste se dividió en alícuotas de igual volumen en nuevos tubos eppendorf y se llevaron a sequedad en un concentrador SpeedVac para su posterior análisis mediante GC-MS y UHPLC-QTOF-MS.

Para el análisis mediante GC-MS, el extracto seco se sometió a una derivatización química en dos etapas. La primera etapa, consiste en una metoximación para

la protección de los grupos carbonilos mediante la adición de 50 μL de hidrocloreuro de metoxiamina en piridina ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e incubación a 80°C durante 15 min. La segunda etapa consiste en una sililación mediante la adición de 50 μL de *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) y bajo las mismas condiciones de incubación.

En el caso del análisis mediante UHPLC-QTOF-MS, el extracto seco se reconstituyó en 0.1 mL de la misma mezcla de metanol/MTBE y se inyectó directamente en el sistema.

Para evaluar la estabilidad y reproducibilidad de los análisis, se prepararon controles de calidad (QC) mediante la adición de volúmenes iguales de todos los extractos de cerebro.

4.6.2 Análisis de las muestras para la obtención del perfil metabolómico

El perfil metabolómico de las muestras de cerebro se obtuvo mediante la aplicación de dos plataformas analíticas diferentes, GC-MS y UHPLC-QTOF-MS, de forma que se cubriera un mayor rango de metabolitos. El análisis mediante GC-MS se llevó a cabo en un Trace GC Ultra acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones ITQ 900. Se inyectó 1 μL de la muestra anteriormente descrita en una columna capilar VF-5MS (30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μm) en modo *splitless*. Se usó helio como gas portador a un flujo de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y la temperatura del inyector se fijó a 280°C . El programa de temperatura se recoge en la tabla 16, siendo el tiempo total de análisis de 18 min. El espectro de masas se adquirió en modo *full-scan* en un rango de masas de 35-650 m/z .

Etapa	Temperatura	Tiempo	Velocidad
1 (mantenimiento)	100°C	2 min	-
2 (rampa)	100- 200°C		$5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$
3 (mantenimiento)	200°C	3 min	
4 (rampa)	200- 300°C		$10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$
5 (mantenimiento)	300°C	5 min	

Tabla 16. Programa de temperatura para el análisis mediante GC-MS

Para el análisis mediante UHPLC-QTOF-MS se empleó un sistema 1290 Infinity UHPLC acoplado a un detector Agilent 6550 iFunnel QTOF MS. Las condiciones cromatográficas fueron las del método propuesto por Fernández-García et al. 2019 [2] con algunas modificaciones. Se inyectaron 5 μL de muestra a través de una columna InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 (150 mm x 2.1 mm, 2.7 μm) con una pre-columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 (5 mm x 2.1 mm, 2.7 μm) termostatzadas a 60°C.

La fase móvil A (10 mM formiato amonio en agua Milli-Q) y la fase móvil B (10 mM formiato amonio en metanol:isopropanol (85:15)) fueron bombeadas a un flujo de 0.4 mL·min⁻¹. El gradiente cromatográfico comenzó con un 82% B, aumentando a 96% en 30 min y al 100% en 38.5 min, el cual se mantuvo durante 2 min. Finalmente se volvió a las condiciones iniciales a los 42 min y se mantuvieron durante 3 min. El sistema de MS operó en ambos modos de adquisición, positivo y negativo, en un rango de *full scan* entre 100-1200 m/z, y aplicando los parámetros recogidos en la Tabla 17.

El equipo fue calibrado antes del análisis de cada lote de muestras con una mezcla estándar de masas de referencias proporcionadas por Agilent Technologies. La corrección de las masas se realizó mediante la introducción continua de las masas de referencia m/z 121.0509 y m/z 922.0098 para el modo de ionización positivo, y las masas m/z 119.0363 y m/z 966.0007 para el modo de ionización negativo.

Parámetros 6550 iFunnel Q-TOF	
Voltaje capilar	3500 V
Flujo gas de secado	14 L·min ⁻¹
Temperatura	350°C
Nebulizer gas	35 psig
Voltaje fragmentación	380V
Voltaje de radio frecuencia del octapolo	750 V
Modo adquisición	Centroide
Velocidad de scan	1 spectra·s ⁻¹

Tabla 17. Parámetros de adquisición del sistema Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS

4.6.3 Procesado de datos

Los datos obtenidos mediante GC-MS fueron importados al software Thermo File Converter (Thermo Scientific) para convertirlos en un formato CDF para su posterior procesamiento aplicando la metodología descrita por Katajamaa and Oresic [3]. Este procesamiento incluye un filtrado, detección de *features*, alineación de los picos y normalización de los datos usando el software XCMS incluido en la plataforma R. El algoritmo empleado divide los datos en diferentes cromatogramas de iones extraídos (XIC) con un ancho de m/z constante de 0.1 Da. A continuación, cada división del cromatograma se filtra mediante filtración combinada usando la segunda derivada de la función Gaussiana como modelo de ajuste de picos. Para extraer la máxima información posible se optimizaron los parámetros de XCMS. Se ajustó un valor umbral de señal/ruido (S/N) a un valor de 2 y la anchura a la mitad de la altura del pico (fwhm) a un valor de 3. Tras la extracción, se realizó una corrección en la agrupación de los picos y su tiempo de retención (proceso de alineación), empleando tres ciclos iterativos con un ancho de banda (bw) descendente desde un valor de 5 a 1s. La normalización de los datos se llevó a cabo empleando el método de normalización LOESS (*locally weighted scatterplot smoothing*) que permite la corrección de la variabilidad intermuestral. Finalmente, los datos pre-procesados fueron exportados en forma de archivo .csv Y se emplearon en los futuros análisis estadísticos en plataformas o softwares como MetaboAnalyst 5.0 o SIMCA-P+ 11.5 (UMetrics, Umea, Sweden).

Los datos obtenidos mediante UHPLC-QTOF-MS fueron pre-procesados con el software Agilent MassHunter Profinder software B.10.0 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) empleando el algoritmo de extracción *Molecular Features Extraction (MFE) for small molecules* aplicando los parámetros de la Tabla 18 para extraer tantas entidades como sea posible.

Extraction parameters	
Use peaks with height	600
Ion species	+H, +NH ₄ , -H, +HCOO
Compound binning and alignment	
RT tolerance	0.9
Mass tolerance	± 20 ppm / 2 mDa
Find by ion	
Chromatogram extraction	± 35
Score	70%
Integration	Agile 2
Limit extraction range	1.5 min
Smoothing function	Gaussian
Absolute area	20000 counts

Tabla 18. Parámetros del algoritmo de extracción *Molecular Features Extraction (MFE) for small molecules*.

4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos procesados para evaluar las diferencias significativas entre grupos de estudio se llevó a cabo mediante la creación de modelos univariantes y multivariantes. Para ello, se emplearon los software estadísticos SIMCA-P+ 11.5 y Mass Profiler Professional (MPP) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

El análisis univariante incluye un test ANOVA, test-t y una corrección mediante Benjamini-Hochberg ($\alpha=0.05$). En los análisis multivariantes, se aplicaron modelos no supervisados (análisis de componentes principales, PCA) y supervisados (análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, PLS-DA). La validación de los modelos se llevó a cabo mediante la evaluación de los parámetros R^2 y Q^2 . R^2 proporciona una medida del ajuste del modelo a los datos originales, y Q^2 proporciona una medida interna de consistencia entre los datos originales y los predichos por validación cruzada.

Para distinguir con criterio estadístico las variables responsables de la clasificación se utiliza el parámetro “*Variable Influence on the Projection (VIP)*”, el cual es una suma ponderada de los cuadrados asociada a cada variable (metabolito) que indica la importancia

de esta en el modelo. Según las referencias bibliográficas consultadas, sólo los metabolitos con un valor VIP en torno a 1 ó mayor, suelen considerarse como influyentes en la clasificación. En nuestro caso, se han seleccionado aquellos metabolitos con un $VIP > 1$, a fin de utilizar un criterio poco restrictivo y aumentar el número de metabolitos a considerar como posibles biomarcadores.

La proporción de cambio en la abundancia de los metabolitos de cada comparación se calculó mediante el parámetro *Fold change (FC)*. Este parámetro describe el grado de cambio de cantidad entre el valor final (Y) y el original (X) empleando la fórmula $(Y/X)-1$. Si el valor de $FC > 0$ la cantidad relativa estaba aumentada, y si $FC < 0$ la cantidad está disminuida.

4.8 Identificación de compuestos y rutas metabólicas

Para identificar los compuestos adquiridos mediante el análisis de GC-MS, se empleó la librería NIST Mass Spectral Library (NIST 02), considerando solo aquellos metabolitos con un índice de similaridad de $\geq 80\%$ y un valor del índice de retención de Kovat concordante. En el caso de los compuestos obtenidos mediante el análisis UHPLC-QTOF-MS, se realizó inicialmente una identificación tentativa buscando la m/z exacta en las bases de datos disponibles como METLIN [4], HMDB [5] y KEGG [6].

Los mapas de calor de agrupamiento jerárquico y el análisis e interpretación de las rutas metabólicas se llevó a cabo en la plataforma online MetaboAnalyst 5.0 [7].

4.9. Análisis estadísticos

Para el análisis de la microbiota, la normalización mediante escalado de suma total (TSS), los test multivariantes y la minería de datos se llevó a cabo empleando la plataforma web Calypso (versión 8.56). Se obtuvieron también los índices Chao1 y Shannon para el análisis de la diversidad alfa y la distancia Bray-Curtis para la diversidad beta. Los índices de diversidad *alfa* se obtuvieron después de una rarefacción a 93525 secuencias (número mínimo de lecturas por muestra). Se realizó un análisis estadístico multivariante de

varianza (ADONIS) y el análisis discriminante de redundancia (RDA). Las diferencias de abundancia relativa (%) entre grupos en diferentes niveles taxonómicos se probaron utilizando el test de Kruskal-Wallis con la tasa de prueba de falso descubrimiento (FDR) para la corrección de prueba múltiple. El nivel de significancia estadística para todas las pruebas se fijó en $p < 0.05$.

Por último, los análisis de correlaciones entre la microbiota intestinal y las concentraciones de selenoproteínas o metabolitos se llevó a cabo aplicando un test de correlación de Spearman en el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA), con un criterio de significación de 0.05. Los *heatmap* de correlaciones se generaron con el software R Project (versión 4.0.2) empleando el siguiente script:

```
install.packages("pheatmap")

library("pheatmap")

library("RColorBrewer")

data <- read.csv2(file="metabolites_b.txt", sep="\t", dec=".", check.names=FALSE)

genus <- read.csv2(file="genus_b.txt", sep="\t", dec=".", check.names=FALSE)

corr <- cor(genus, data, method="spearman", use="na.or.complete")

col <- colorRampPalette(brewer.pal(10, "RdYlBu"))(256)

pheatmap(corr, col = col, margins=c(10,10), scale = "none", labels_row =
as.expression(la ply(rownames(corr), function(a) bquote(italic(. (a))))))
```

5. Referencias

- [1] A.L. Rusanov, A. v Smirnova, A.A. Poromov, K.A. Fomicheva, N.G. Luzgina, A.G. Majouga, Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells, Toxicology in Vitro. 29 (2015) 1006–1011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.018>.
- [2] M. Fernández-García, F. Rey-Stolle, J. Bocard, V.P. Reddy, A. García, B.M. Cumming, A.J.C. Steyn, S. Rudaz, C. Barbas, Comprehensive Examination of the Mouse Lung Metabolome Following Mycobacterium tuberculosis Infection Using a Multiplatform

- Mass Spectrometry Approach, *Journal of Proteome Research*. 19 (2020) 2053–2070.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00868>.
- [3] M. Katajamaa, M. Orešič, Data processing for mass spectrometry-based metabolomics, *Journal of Chromatography A*. 1158 (2007) 318–328.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.021>.
- [4] <https://metlin.scripps.edu>, (n.d.).
- [5] <https://hmdb.ca/>, (n.d.).
- [6] <https://www.genome.jp/kegg/>, (n.d.).
- [7] <https://www.metaboanalyst.ca/>, (n.d.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I

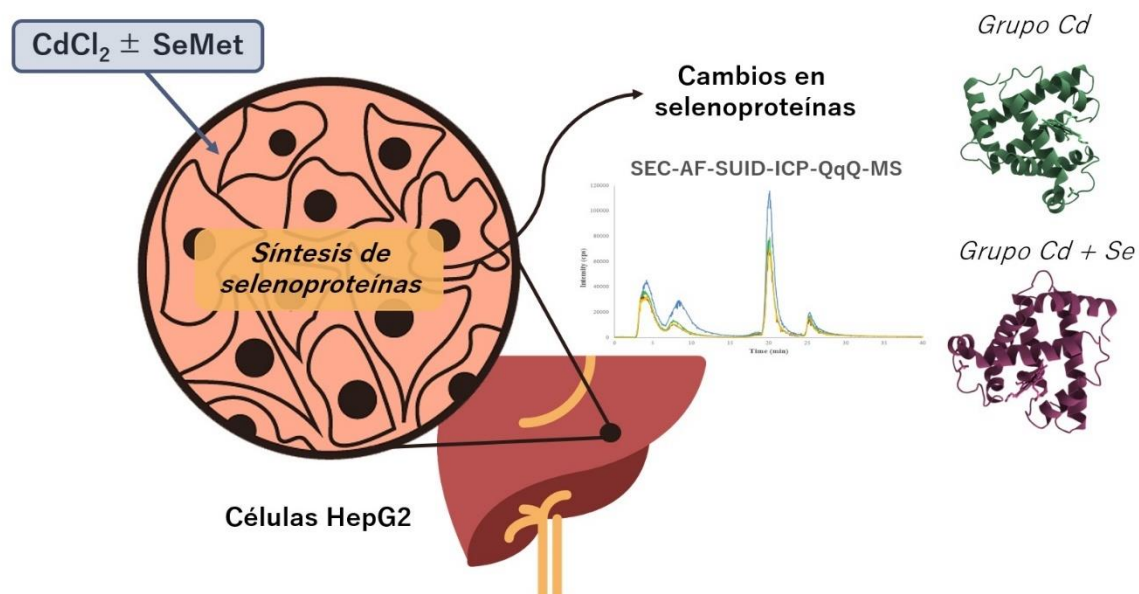
Chapter I

Interacción antagonista de selenio y cadmio en células hepáticas humanas a través de las selenoproteínas

“Antagonistic interaction of selenium and cadmium in human liver cells through selenoproteins”

S. Ramírez-Acosta, R. Uhlířová, F. Navarro, J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera

Frontiers in Chemistry. Submitted



Antagonistic interaction of selenium and cadmium in human hepatic cells through selenoproteins

Sara Ramirez-Acosta¹, Renata Uhlířová², Francisco Navarro³, Jose Luis Gomez-Ariza¹, Tamara García Barrera^{1*}

¹Research Center for Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA). Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen, University of Huelva, Spain, ²Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Faculty of Chemistry, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic., Czechia, ³Department of Integrated Sciences, Cell Biology, Research Center for Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA). Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen, University of Huelva, Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Chemistry

Specialty Section:
Analytical Chemistry

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
891933

Received on:
08 Mar 2022

Revised on:
05 Apr 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

TGB, FNR and JLGA conceived the idea. SRA and RP performed the experimental work. SRA and TGB drafted the manuscript and SRA prepared the artworks. TGB and FNR supervised the whole work. TGB acquired the funding and administrate the project. All the authors crucially revised the manuscript for important intellectual content and approved the final version to be published.

Keywords

cadmium¹, selenoprotein3, HepG2⁴, ICP-QQ-MS⁵, column switching⁶, isotopic dilution⁷, selenomethionine²

Abstract

Word count: 243

Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal for humans and animals, which is associated with acute hepatotoxicity. Selenium (Se) confers protection against Cd-induced toxicity in cells, diminishing the levels of ROS and increasing the activity of antioxidant selenoproteins such as glutathione peroxidase (GPx). The aim of this study is to evaluate the antagonistic effect of selenomethionine (SeMet) against Cd toxicity in HepG2 cells, through the modulation of selenoproteins. To this end, the cells were cultured in the presence of 100 μ M SeMet, 5 μ M, 15 μ M and 25 μ M CdCl₂ and a combination of both species for 24 h. At the end of the experiment, cell viability was determined by MTT assay. The total metal content of Cd and Se was analyzed by inductively triple quadrupole coupled plasma mass spectrometry (ICP-QQ-MS). To quantify the concentration of three selenoproteins (GPx, selenoproteins P (SELENOP) and selenoalbumin (SeAlb)) and selenometabolites an analytical methodology based on column switching and species unspecific isotopic dilution approach using two-dimensional size exclusion and affinity chromatography coupled to ICP-QQ-MS was applied. The co-exposure of SeMet and Cd in cells HepG2 enhanced the cell viability and diminished the Cd accumulation in cells. Se supplementation increased the levels of selenometabolites, GPx, SELENOP and SeAlb, however the presence of Cd resulted in a significant diminution of selenometabolites and SELENOP. These results suggest that SeMet may affects to the accumulation of Cd in cells, as well as a suppression of selenoprotein synthesis induced by Cd.

Contribution to the field

Although the toxicity of Cd is well-known as well as the antagonistic role of Se-supplementation, limited information is available in relation to the possible effects of Se on Cd-bioaccumulation and the selenoproteome of hepatic cells. To this end, we cultured hepatic cells in the presence of Cd and/or Se and we determined the cell viability, Cd-bioaccumulation and the selenoproteome. Hepatic cell selenoproteins were quantified for the first time by an analytical methodology based on column switching and species unspecific isotopic dilution approach using two-dimensional size exclusion and affinity chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. The co-exposure of Se and Cd in cells led to improved cell viability and lower Cd accumulation. Se supplementation increased the levels of selenometabolites and selenoproteins, however the presence of Cd resulted in a significant diminution of selenometabolites and selenoprotein P. These results suggest that Se may affects to the accumulation of Cd in cells, as well as the selenoproteome.

Funding statement

All sources of funding received for the research being submitted.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

In review

Data availability statement

Generated Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

In review



Antagonistic interaction of selenium and cadmium in human hepatic cells through selenoproteins

S. Ramírez-Acosta¹, R. Uhlírová², F. Navarro^{3*}, J.L. Gómez-Ariza¹, T. García-Barrera^{1*}

¹Research Center for Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA). Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007, Huelva, Spain.

²Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Faculty of Chemistry, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic.

³Research Center for Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA). Integrated Sciences, Cell Biology, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007, Huelva, Spain.

*Correspondence: Tamara García Barrera
tamara@dqcm.uhu.es

Co-corresponding author: Francisco Navarro
fnavarro@uhu.es

Keywords: cadmium¹, selenomethionine², selenoproteins³, HepG2⁴, ICP-QqQ-MS⁵, column switching⁶, isotopic dilution⁷

Abstract

Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal for humans and animals, which is associated with acute hepatotoxicity. Selenium (Se) confers protection against Cd-induced toxicity in cells, diminishing the levels of ROS and increasing the activity of antioxidant selenoproteins such as glutathione peroxidase (GPx). The aim of this study is to evaluate the antagonistic effect of selenomethionine (SeMet) against Cd toxicity in HepG2 cells, through the modulation of selenoproteins. To this end, the cells were cultured in the presence of 100 μ M SeMet, 5 μ M, 15 μ M and 25 μ M CdCl₂ and a combination of both species for 24 h. At the end of the experiment, cell viability was determined by MTT assay. The total metal content of Cd and Se was analyzed by inductively **triple quadrupole** coupled plasma mass spectrometry (ICP-QqQ-MS). To quantify the concentration of three selenoproteins (GPx, selenoproteins P (SELENOP) and selenoalbumin (SeAlb)) and selenometabolites an analytical methodology based on column switching and species unspecific isotopic dilution approach using two-dimensional size exclusion and affinity chromatography coupled to ICP-QqQ-MS was applied. The co-exposure of SeMet and Cd in cells HepG2 **enhanced the** cell viability and **diminished the** Cd accumulation in cells. Se supplementation increased the levels of selenometabolites, GPx, SELENOP and SeAlb, however the presence of Cd resulted in a significant diminution of selenometabolites and SELENOP. These results suggest that SeMet may affects to the accumulation of Cd in cells, as well as a suppression of selenoprotein synthesis induced by Cd.

36

37 Introduction

38 Cadmium (Cd) is a highly toxic metal present in the environment as consequence of natural and
 39 anthropogenic processes, causing its entry and accumulation in the food chain (Rigby and Smith,
 40 2020). Cd toxicity depends on the dose, route and duration of exposure producing numerous disorders
 41 in humans, including reproductive failure (Nasiadek et al., 2019), DNA damage (Jia et al., 2011) and
 42 it is classified as a human carcinogen (Chen et al., 2019). Selenium (Se) is an essential trace element
 43 in mammals that can be presented in organic species (selenoamino acids, such as selenocysteine
 44 (SeCys), selenomethionine (SeMet), methylated species such as dimethyl selenide (DMSe) or methyl
 45 selenol (CH₃SeH) and Se-containing proteins like selenoalbumin (SeAlb)) and inorganic species
 46 (SeO₃²⁻, SeO₄²⁻) (Fairweather-Tait et al., 2010a). The main source of Se comes from food and
 47 nutritional supplements, (Wang et al., 2016). Se bioavailability depends on many factors, but it is
 48 generally attributed to its chemical form. The absorption of all Se species is relatively high, between
 49 70-95%, but differs on the source and the Se status of the individual (Finley, 2006). Inorganic species
 50 are better absorbed but less retained by the body than the organic forms (Fairweather-Tait et al., 2010b).
 51 Food supplements are based on the use of selenium-enriched yeast, since they are the main source of
 52 SeMet. Most of the Se ingested is used for synthesis of selenoenzymes, including selenoproteins from
 53 families of glutathione-peroxidase (GPXs), thioredoxin reductase (TRXRs) and deiodinases (DIOs)
 54 which are involved in numerous metabolic processes (Schomburg et al., 2004). Animal studies have
 55 revealed the protective role of Se against Cd in liver and kidney, the most sensitive organs to the
 56 toxicity of this element. The positive effect of Se is mainly attributed to selenoproteins (Huang et al.,
 57 2012; Bouklizar et al., 2016). *In vitro* models have become an effective alternative to the use of animal
 58 experiments and allow the elucidation of the mechanism of action of Se against toxic metals. The Cd/Se
 59 interaction has been studied in different cell lines. For example, the results from SH-SY5Y
 60 catecholaminergic neuroblastoma cell line showed that treatment with 10 µM CdCl₂ and 100 nM
 61 sodium selenite (Na₂SeO₃) attenuate the changes in terms of oxidative stress and neuronal sprouting
 62 caused by Cd (Branca et al., 2018). Ren et al. (Ren et al., 2020) reported that Se-pretreatment (Na₂SeO₃)
 63 markedly represses Cd-induced apoptosis in Leydig TM3 cells. In addition, the level of reactive oxygen
 64 species (ROS) decreases and the c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway is blocked. On the
 65 other hand, in avian leghorn male hepatoma (LMH) cell line Se intervention, in form of Na₂SeO₃,
 66 inhibited Cd-induced lactate dehydrogenase (LDH) release and endoplasmic reticulum (ER) stress
 67 crosstalk and autophagy by regulating intracellular Ca²⁺ homeostasis (Zhang et al., 2020b). Also, Cd-
 68 induced intracellular Ca²⁺ overload was mitigated by the Ca²⁺/calmodulin (CaM)/calmodulin kinase IV
 69 (CaMK-IV) signaling pathway (Zhang et al., 2020b).

70 However, although the interaction of Se and Cd has been previously reported in human cells (Bianga
 71 et al., 2014; Marschall et al., 2017), the information about the influence of Cd exposure and Se-
 72 supplementation on Se metabolites and expression profiles of selenoproteins is limited. To this end,
 73 the selenoproteome of hepatic carcinoma cells was quantified after Cd and/or Se exposure by a column-
 74 switching combining affinity chromatography and size exclusion chromatography coupled to triple
 75 quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-QqQ-MS).

76 Materials and Methods

77 Preparation of cadmium and selenium solution

78 Stock standards solutions of CdCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and SeMet (Sigma-Aldrich,
 79 St. Louis, MO, USA) were prepared in deionized water using a Milli-Q system (Millipore, Burlington,

Running Title

MA, USA) at a concentration of 10 mM. This solution was sterilized using a syringe filter with 0.22 μm pore size and stored in darkness at 4°C. A working solution of 1000 μM of Cd and SeMet was prepared freshly in culture media before each exposure experiment.

Cell culture

Hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line was purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), 1% non-essential amino acids (NEAA) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), 1% penicillin-streptomycin (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) and maintained at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ and 95% relative humidity. The medium was changed every 48 hours. Once reached 80% of confluence, the cells were detached using TrypLE Express (trypsin replacement) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) and sub-cultured once a week.

Cytotoxicity assay

Cell cytotoxicity induced by Cd and SeMet on HepG2 cells were evaluated by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) assay. Briefly, HepG2 cells were cultured in 6-well plate at a density of 5×10^5 cells/well and incubated for 24h. After a grow cell cycle, cells were exposed for 24 h to increasing Cd and Se concentrations, ranging from 0 – 100 μM , in order to determine their effects on cell viability. At the end of time exposure, culture medium was removed and, 400 μl of MTT solution ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) was added and incubated for another 3h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The MTT solution was discarded, and the reaction product obtained, formazan, is solubilized with sodium dodecyl sulfate (SDS) (Fisher Scientific Co, Nepean, Ontario, Canada) solution (10% p/v). Finally, the absorbance was measured at a wavelength of 540 nm using a Helios Gamma UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Cell viability is expressed as percentage relative to control group. The cells cultured in standard medium was used as positive control (100% of viability).

Cell exposure

Cell viability was not affected after selenium exposure in the entire range of concentrations studied (Figure 1). Therefore, a final concentration of 100 μM Se was chosen for the subsequent experiment exposure. In the case of Cd, a significant reduction of >70% on cell viability was observed at concentrations higher than 30 μM (Figure 1). Consequently, three different Cd concentration lower than 30 μM were employed. To determine the interactions of these elements in the *in vitro* model of HepG2 cells, they were exposed during 24h to 100 μM SeMet, alone or in combination with different Cd concentrations, as follows: (i) 0 μM Cd + 0 μM Se (control group), (ii) 100 μM Se (Se group), (iii) non-cytotoxic concentration of 5 μM Cd (Cd5 group), (iv) 5 μM Cd + 100 μM Se (Cd5+Se group), (v) lowest effective dose of 15 μM (Cd15 group), (vi) 15 μM Cd + 100 μM Se (Cd15+Se group), (vii) high effective dose of 25 μM Cd (Cd25 group) and (viii) 25 μM Cd + 100 μM Se (Cd25+Se group).

At the end of the experiment, cells were washed with phosphate-buffer saline (PBS) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) three times and then collected by mechanical harvesting using a cell scraper to ensure the integrity of the cells and to avoid chemical interferences with other reagents.

Determination of Se and Cd content

Total metal content in cell pellets as well as culture media were analyzed in an ICP-QQQ-MS model Agilent 8800 Triple Quad (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Harvested cells were previously homogenized with a buffer solution containing 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

Running Title

USA), 10% glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% sodium dodecyl sulfate (Fisher Scientific Co, Nepean, Ontario, Canada). The cell homogenate was submitted to a microwave-assisted acid digestion using a Mars 6 reaction system (CEM Corporation, Matthews, NC, USA). For this, an aliquot of 100 μ L of cell sample was digested in 490 μ L HNO₃ (Fisher Scientific Co, Nepean, Ontario, Canada) and 10 μ L HCl (Fisher Scientific Co, Nepean, Ontario, Canada). The mineralization was carried out at 200 W from room temperature ramped to 180°C for 30 min and hold 10 min. A second ramp from 200W to 400W for 20 min and hold 20 min was performed. After digestion, cell samples were 5-fold diluted to achieve final concentration of 5% HNO₃ and 100 μ g·L⁻¹ of Rh (internal standard) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and filtered through 0.45 μ m PTFE syringe filters.

For the analysis of culture media, an aliquot of 1 mL of sample were collected and diluted using the same procedure as cell samples. The ICP-QqQ-MS operational conditions is shown in Table S1. The certified reference material BCR-274 Single Cell Protein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to validate the methodology (Table S2).

Selenoproteins speciation

Selenoproteins were extracted from HepG2 cells using the CellLytic™ MT extraction reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's instructions with some brief modifications. A cell pellet of 15·10⁶ cells were lysed with 100 μ L of CellLytic™ MT containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a shaker for 15 min. Then, the lysed cells were centrifuged at 15500 g for 10 min at 4°C and the supernatant was collected for the subsequent analysis. The chromatographic separation of the selenoproteins (GPx, SELENOP and SeAlb) was performed as described elsewhere (Callejón-Leblic et al., 2018), using the column switching method that allows the simultaneous separation of selenoproteins and selenometabolites. The separation consists in two 5 mL HiTrap® Desalting Columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) connected in series with a 1 mL heparine-sepharose (HEP-HP) column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and a 1 mL blue-sepharose (BLUE-HP) column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using an ultra-high performance liquid chromatograph (model 1260 Infinity Quaternary LC, Agilent Technologies, Tokyo, Japan). The absolute quantification of selenoproteins was carried out in an ICP-QqQ-MS model Agilent 8800 Triple Quad (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) employing the conditions from Table S1. For the isotope dilution analysis, ⁷⁴Se (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) was also introduced via T-connector into the system.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using Minitab21 Statistical Software (State College, PA, USA). The results are expressed as means $\pm$ SD of at least three replicates of each group. All experiments were repeated three times. Anderson-Darling normality test was used to determine whether data are not normally distributed. Differences between groups were tested using the Kruskal-Wallis test (no normal distribution) and ANOVA (normal distribution). The level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effects of CdCl₂ and SeMet on Cell Viability

To select the dosage for the exposure, HepG2 cells were treated with a range of concentration from 0 to 150 μ M of SeMet and CdCl₂ during 24h. After the exposure, cell viability was measured by MTT method. Selenomethionine exposure did not affected the cell viability of HepG2 cells in the range of

Running Title

concentrations from 10-100 μM , but a slight decrease was noticed at a concentration of 150 μM (Figure 1). Therefore, a final concentration of 100 μM SeMet was chosen for the subsequent experiment exposure. In the case of Cd, a reduction of >15% on cell viability was observed at concentrations higher than 10 μM (Figure 1) and, at a concentration of 30 μM of CdCl_2 a significant cell reduction of 70% was detected. Consequently, three different concentrations of CdCl_2 were used (5, 15 and 25 μM).

To evaluate the effects on cell viability of the selected CdCl_2 concentrations alone and in combination with SeMet, a new MTT assay was carried out. The results are presented in Figure 2. The lowest concentration of CdCl_2 (Cd5 group) reduce cell viability to $91.19 \pm 2.50\%$, but the combination with SeMet (Cd5+Se group) did not significantly affect cell viability ($p = 0.591$). The result for Cd15 group was $70.27 \pm 1.44\%$, and the presence of SeMet (Cd15+Se) increased the cell survival to $75.82 \pm 2.02\%$ ($p = 0.018$). In Cd25+Se group a very significant increase to $46.01 \pm 1.89\%$ compared to Cd25 group ($35.04 \pm 0.09\%$) was detected. Our results showed that Cd hepatotoxicity could be mitigated by SeMet supplementation.

Cadmium and Selenium concentrations in HepG2 cells and culture media

The analysis of Se and Cd by ICP-QQQ-MS in cell pellets and culture media are summarized in (Table 1). The detection limits obtained for the analytical procedure (LOD) were $0.008 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ for Se and $0.001 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ for Cd. The basal concentration (control group) of Se in HepG2 cells is $0.052 \mu\text{M}$ while the concentration of Cd was <LOD. In the culture medium, the concentrations of both elements were <LOD. The groups not exposed to SeMet resulted in similar concentrations in all of them, varying in the range $0.032\text{-}0.041 \mu\text{M}$. The addition of SeMet in the culture medium resulted in an uptake by HepG2 cells of between $11.02\text{-}15.494 \mu\text{M}$. The concentration of Cd in the Cd5 and Cd5+Se groups were $3.851 \mu\text{M}$ and $3.916 \mu\text{M}$ respectively, and no statistically significant differences were observed (Table 2). This assumes an absorption of approximately 78% of the exposed Cd by the cells. However, the cells exposed to a concentration of 15 μM of Cd absorbed between 56-58% of the exposed Cd, showing a slight, but significant increase in the Cd15+Se group ($p = 0.014$). At the maximum concentration, 25 μM Cd, HepG2 cells only absorb between 34-36% of the total Cd. Total Cd content in Cd25+Se group was slightly higher ($p = 0.02$).

Selenoproteins speciation

To elucidate whether Cd interferes with selenoprotein synthesis, the concentration of selenometabolites and selenoproteins (GPx, SELENOP and SeAlb) has been quantified using a column switching and species unspecific isotopic dilution approach. Figure 3 shows the typical chromatogram for the Se, Cd5+Se, Cd15+Se and Cd25+Se groups. The relative concentration of the selenoproteins and selenospecies in HepG2 cells is $\text{SELENOP} > \text{GPx} > \text{Se-metabolites} > \text{SeAlb}$. Table 2 summarizes the results obtained from the quantification of selenoproteins and selenometabolites for the different study groups. The results of the statistical analysis are included in Table 3.

As can be observed in Table 2, the concentration of GPx, selenometabolites, SELENOP and SeAlb in control HepG2 cells is 0.010 , 0.022 , 0.03 and $0.004 \mu\text{g Se/g}$, respectively. After exposure for 24 h with SeMet, the concentration of the species increases significantly (Table 3), reaching values of $20,495 \mu\text{g Se/g}$ for GPx, $16,378 \mu\text{g Se/g}$ for selenometabolites, $25,200 \mu\text{g Se/g}$ of SELENOP and $3.041 \mu\text{g Se/g}$ of SeAlb.

The concentration of selenometabolites was also slightly increased in cells cultured with different doses of Cd. Regarding selenoproteins, only SELENOP concentration increased in cells that were exposed

Running Title

to 5 μM Cd, but not at higher concentrations (15 μM and 25 μM). The co-exposure of SeMet and Cd provokes a decrease in the concentration of GPx in all study groups. However, no statistically significant changes are observed (Table 3). The concentration of selenometabolites in the Se group was 16.378 $\mu\text{g Se/g}$. The Cd exposure significantly decreases the concentration to values of 4.889 $\mu\text{g Se/g}$ (Cd5+Se), 1.773 $\mu\text{g Se/g}$ (Cd15+Se) and 2.269 $\mu\text{g Se/g}$ (Cd25+Se). The SELENOP concentration was also decreased to values of 21.642 $\mu\text{g Se/g}$ (Cd5+Se), 13.405 $\mu\text{g Se/g}$ (Cd15+Se), 15.665 $\mu\text{g Se/g}$ (Cd25+Se) respect to the value of the Se group (25.200 $\mu\text{g Se/g}$). SeAlb concentration was only diminished in cells from Cd15+Se group.

Discussion

The results obtained from this study indicate that intracellular Cd concentration of the groups Cd15+Se and Cd25+Se were significantly lower than those exposed to Cd, and the total Se content was also decreased. Frisk et al. (Frisk et al., 2002) reported a similar study using K-562 cells that were either pre-treated or simultaneously treated with selenite or selenomethionine (5 or 50 μM) and cadmium nitrate (60 or 75 μM). Their results showed that the pre-treatment with Se in caused a lower concentration of Cd in the cells when they were exposed to higher concentration of Cd (75 μM), but not at the lower concentration (60 μM). On the other hand, the simultaneous treatment of both elements caused an increase in the intracellular Cd at all concentrations, suggesting that Se may affect to Cd transport to cells.

In mammals, depending on the bioavailability of Cd, it can behave like other essential elements and can be better assimilated, inducing an imbalance in the normal balance of trace elements and destroying the structure and function of cells (Martelli et al., 2006). Our results indicate that the Cd content was reduced, pointing out that the interaction between Se and Cd produced a Cd-Se complex that affects the composition of these metals in the hepatocyte and presumably in the liver, since this same effect has been seen in the liver of rabbits exposed to Cd and Se (Zhang et al., 2021), however the opposite effect has been observed in mice that were exposed to low and high levels of Se simultaneously with Cd, resulting in a higher Cd concentration in the liver (Rodríguez-Moro et al., 2020).

On the other hand, the effects against Cd-induced hepatotoxicity in birds have also been quantified (Li et al., 2013). Results showed that dietary selenite decreased Cd accumulation and improved antioxidant defense, which attenuated adverse Cd-mediated morphological changes and oxidative stress in liver tissue (Li et al., 2013).

The protective role of Se has been demonstrated by restoring hepatic blood markers such as alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and total bilirubin, (Renugadevi and Prabu, 2010; Abu-El-Zahab et al., 2019; Wang et al., 2020) and antioxidant enzymes such as catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) (Ognjanović et al., 1995; Štajn et al., 1997; Jihen et al., 2009), the mechanisms by which trace metal Se suppresses Cd hepatotoxicity in mammals remain unclear.

Regarding selenoprotein concentration, the Se absorption efficiency in HepG2 cells depends on its chemical form, being organic species more easily transported and assimilated than inorganic species (Wang et al., 2016; Takahashi et al., 2017). The results obtained from this study indicated that the concentration of GPx was not affected by the presence of Cd compared to control cells, but there was a slight decrease in the cells cultured with SeMet. GPx is employed as an oxidative biomarker, as its activity is generally induced in response to mild oxidative stress as a defense mechanism. However, a

Running Title

rapid increase in intracellular ROS generation can overwhelm antioxidant mechanisms, resulting in a suppression of antioxidant enzymes (Cozzari et al., 2015).

As seen in both *in vivo* and *in vitro* studies, Se supplementation and exposure results in increased activity, expression, and concentration of most selenoproteins (Stoedter et al., 2010; Zwolak and Zaporowska, 2012; Nelson et al., 2016; Sun et al., 2020; Liu et al., 2021). In liver cells, the expression of SELENOP and GPx3 exposed to SeMet, MeSeCys and Na₂SeO₃ was increased compared to control cells (Takahashi et al., 2017). An increase in the expression of other selenoproteins such as GPx1 and SELENOK has also been correlated with higher concentration of sodium selenite (Rusolo et al., 2013). In the study by Jamwal et al. (Jamwal et al., 2016), the GPx activity was significantly (~35%) decreased in trout hepatocytes treated with Cd alone or in combination with high concentration of selenite or SeMet (250 µM) relative to control cells. However, a partial recovery of GPx activity was recorded in hepatocytes exposed to 100 µM Cd in combination with 25 µM selenite or SeMet.

The expression of 24 selenoproteins was determined in chicken hepatocytes that were cultured for 24 h with 5 µM Cd, 1 µM Se and a mixture of both concentrations (Zhang et al., 2020a). The results presented that 18 of 24 selenoprotein transcripts (GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, SelT, Sel15, SelP1, SelP2, TXNRD2, TXNRD3, DIO2, DIO3, SelS, SelK, SelN, SelO, SelU and SelH) were over-upregulated and SelW, TXNRD1 and SelX transcripts were downregulated in the Se group compared to the Control group. When cells were cultured with Cd and Se, only 9 transcripts were overexpressed (GPX1, SelT, SelP1, SelP2, SelS, SelK, SelN, SelO, and SelM) and 2 decreased (SelW and SelU) when compared with the group only exposed to Cd (Zhang et al., 2020a).

Selenoproteins may be involved in the antagonistic process against Cd toxicity. In kidney and testicular tissues, it has been seen that Se protected against Cd toxicity by increasing the expression of most of the selenoproteins, including SELENOP and GPX (Messaoudi et al., 2010; Lin et al., 2018). However, our results showed a decrease in the concentration of selenoproteins and selenometabolites when cells are exposed to Cd and Se simultaneously. The recent study by Schwarz et al. (Schwarz et al., 2020) has provided a new perspective on the behavior of selenoproteins in the presence of other metals. In his study, HepG2 cells were exposed to variable concentrations of Cu and Se, revealing that Cu suppress the mRNA levels of the selenoproteins GPX1 and SELENOW, and decrease the activities of GPX and TXNRD. The effects of Cu were inhibited by applying copper chelators, showing that this element interferes with the synthesis and activity of selenoproteins through the limitation of UGA coding (Schwarz et al., 2020). The suppression of selenoprotein synthesis by Cd may also be due to the formation of the above-mentioned Cd-Se complex (Zhang et al., 2021).

Finally, SeAlb has been quantified for the first time in HepG2 cells. SeAlb is a Se transporter protein that is formed in serum by the replacement of methionine by selenomethionine and transferred to the liver for the synthesis of selenoproteins. The concentration of SeAlb were higher in all Se-supplemented groups. Comparable results were reported from liver cytosolic extracts of mice exposed to Hg and Se simultaneously (García-Sevillano et al., 2015).

Conclusion

We can conclude that our study has provided new insights into the mechanisms behind the antagonistic interactions between Se against Cd. Se protects HepG2 cells by increasing their cell viability and inhibiting the transport of Cd into cells. The concentration of selenoproteins is also affected by the presence of Cd, interfering with its synthesis, and resulting in a lower concentration of selenoproteins. For a better understanding of the Cd-Se interaction in HepG2 cells, it will be necessary to address new

Running Title

studies involving the study of selenometabolites, markers of oxidative stress and the quantification and characterization of other selenoproteins and the Cd-Se complex.

References

- Abu-El-Zahab, H. S. H., Hamza, R. Z., Montaser, M. M., El-Mahdi, M. M., and Al-Harthi, W. A. (2019). Antioxidant, antiapoptotic, antigenotoxic, and hepatic ameliorative effects of L-carnitine and selenium on cadmium-induced hepatotoxicity and alterations in liver cell structure in male mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 173, 419–428. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.041.
- Bianga, J., Touat-Hamici, Z., Bierla, K., Mounicou, S., Szpunar, J., Chavatte, L., et al. (2014). Speciation analysis for trace levels of selenoproteins in cultured human cells. *Journal of Proteomics* 108, 316–324. doi:https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.025.
- Boukhzar, L., Hamieh, A., Cartier, D., Tanguy, Y., Alsharif, I., Castex, M., et al. (2016). Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal* 24, 557–574. doi:10.1089/ars.2015.6478.
- Branca, J. J. v, Morucci, G., Maresca, M., Tenci, B., Cascella, R., Paternostro, F., et al. (2018). Selenium and zinc: Two key players against cadmium-induced neuronal toxicity. *Toxicology in Vitro* 48, 159–169. doi:https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.007.
- Callejón-Leblic, B., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., and Gómez-Ariza, J. L. (2018). Simultaneous Speciation of Selenoproteins and Selenometabolites in Plasma and Serum. *Methods Mol Biol* 1661, 163–175. doi:10.1007/978-1-4939-7258-6_12.
- Chen, Q. Y., DesMarais, T., and Costa, M. (2019). Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 59, 537–554. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021031.
- Cozzari, M., Elia, A. C., Pacini, N., Smith, B. D., Boyle, D., Rainbow, P. S., et al. (2015). Bioaccumulation and oxidative stress responses measured in the estuarine ragworm (*Nereis diversicolor*) exposed to dissolved, nano- and bulk-sized silver. *Environmental Pollution* 198, 32–40. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.015.
- Fairweather-Tait, S. J., Bao, Y., Broadley, M. R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J. E., et al. (2010a). Selenium in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 1337–1383. doi:10.1089/ars.2010.3275.
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., and Hurst, R. (2010b). Selenium bioavailability: Current knowledge and future research requirements. *American Journal of Clinical Nutrition* 91. doi:10.3945/ajcn.2010.28674J.
- Finley, J. W. (2006). Bioavailability of Selenium from Foods. *Nutrition Reviews* 64, 146–151. doi:10.1111/j.1753-4887.2006.tb00198.x.

Running Title

- 333 Frisk, P., Yaqob, A., and Lindh, U. (2002). Indications of selenium protection against cadmium
334 toxicity in cultured K-562 cells. *Science of The Total Environment* 296, 189–197.
335 doi:https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00080-3.
- 336 García-Sevillano, M. A., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., Navarro, F., and Gómez-Ariza, J.
337 L. (2015). Biological interactions between mercury and selenium in distribution and
338 detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. *Chemico-
339 Biological Interactions* 229, 82–90. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.001.
- 340 Huang, Z., Rose, A. H., and Hoffmann, P. R. (2012). The role of selenium in inflammation and
341 immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 16,
342 705–743. doi:10.1089/ars.2011.4145.
- 343 Jamwal, A., Naderi, M., and Niyogi, S. (2016). An in vitro examination of selenium–cadmium
344 antagonism using primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.
345 *Metallomics* 8, 218–227. doi:10.1039/C5MT00232J.
- 346 Jia, X., Zhang, H., and Liu, X. (2011). Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and
347 oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color. *Fish
348 Physiology and Biochemistry* 37, 97–103. doi:10.1007/s10695-010-9416-5.
- 349 Jihen, E. H., Imed, M., Fatima, H., and Abdelhamid, K. (2009). Protective effects of selenium (Se)
350 and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress.
351 *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1559–1564.
352 doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.006.
- 353 Li, J.-L., Jiang, C.-Y., Li, S., and Xu, S.-W. (2013). Cadmium induced hepatotoxicity in chickens
354 (*Gallus domesticus*) and ameliorative effect by selenium. *Ecotoxicology and Environmental
355 Safety* 96, 103–109. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.007.
- 356 Lin, J., Xia, J., Zhao, H.-S., Hou, R., Talukder, M., Yu, L., et al. (2018). Lycopene Triggers Nrf2–
357 AMPK Cross Talk to Alleviate Atrazine-Induced Nephrotoxicity in Mice. *Journal of
358 Agricultural and Food Chemistry* 66, 12385–12394. doi:10.1021/acs.jafc.8b04341.
- 359 Liu, Y., He, A., Tang, J., Shah, A. M., Jia, G., Liu, G., et al. (2021). Selenium alleviates the negative
360 effect of heat stress on myogenic differentiation of C2C12 cells with the response of
361 selenogenome. *Journal of Thermal Biology* 97, 102874.
362 doi:https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102874.
- 363 Marschall, T. A., Kroepfl, N., Jensen, K. B., Bornhorst, J., Meermann, B., Kuehnelt, D., et al. (2017).
364 Tracing cytotoxic effects of small organic Se species in human liver cells back to total cellular
365 Se and Se metabolites†. *Metallomics* 9, 268–277. doi:10.1039/c6mt00300a.
- 366 Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., and Moulis, J.-M. (2006). Cadmium toxicity
367 in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88, 1807–1814.
368 doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.013.
- 369 Messaoudi, I., Banni, M., Saïd, L., Saïd, K., and Kerkeni, A. (2010). Involvement of selenoprotein P
370 and GPx4 gene expression in cadmium-induced testicular pathophysiology in rat. *Chemico-
371 Biological Interactions* 188, 94–101. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.012.

Running Title

- 372 Nasiadek, M., Danilewicz, M., Klimczak, M., Stragierowicz, J., and Kilanowicz, A. (2019).
373 Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in
374 Female Wistar Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, 6490820.
375 doi:10.1155/2019/6490820.
- 376 Nelson, S. M., Shay, A. E., James, J. L., Carlson, B. A., Urban, J. F., and Prabhu, K. S. (2016).
377 Selenoprotein Expression in Macrophages Is Critical for Optimal Clearance of Parasitic
378 Helminth *Nippostrongylus brasiliensis**. *Journal of Biological Chemistry* 291, 2787–2798.
379 doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684738.
- 380 Ognjanović, B., Žikić, R. v, Stajn, A., Saičić, Z. S., Kostić, M. M., and Petrović, V. M. (1995). The
381 effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium.
382 *Physiol Res* 44, 293–300. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/8869263>.
- 383 Ren, X., Wang, S., Zhang, C., Hu, X., Zhou, L., Li, Y., et al. (2020). Selenium ameliorates cadmium-
384 induced mouse leydig TM3 cell apoptosis via inhibiting the ROS/JNK /c-jun signaling pathway.
385 *Ecotoxicology and Environmental Safety* 192, 110266.
386 doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110266.
- 387 Renugadevi, J., and Prabu, S. M. (2010). Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective
388 effect of naringenin. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62, 171–181.
389 doi:https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.03.010.
- 390 Rigby, H., and Smith, S. R. (2020). The significance of cadmium entering the human food chain via
391 livestock ingestion from the agricultural use of biosolids, with special reference to the UK.
392 *Environment International* 143, 105844. doi:https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105844.
- 393 Rodríguez-Moro, G., Roldán, F. N., Baya-Arenas, R., Arias-Borrego, A., Callejón-Leblic, B.,
394 Gómez-Ariza, J. L., et al. (2020). Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis
395 caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic
396 mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 1762–1775.
397 doi:10.1007/s11356-019-06573-1.
- 398 Rusolo, F., Pucci, B., Colonna, G., Capone, F., Guerriero, E., Milone, M. R., et al. (2013). Evaluation
399 of Selenite Effects on Selenoproteins and Cytokine in Human Hepatoma Cell Lines.
400 *Molecules* 18, 2549–2562. doi:10.3390/molecules18032549.
- 401 Schomburg, L., Schweizer, U., and Köhrle, J. (2004). Selenium and selenoproteins in mammals:
402 extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci* 61, 1988–1995. doi:10.1007/s00018-004-
403 4114-z.
- 404 Schwarz, M., Lossow, K., Schirl, K., Hackler, J., Renko, K., Kopp, J. F., et al. (2020). Copper
405 interferes with selenoprotein synthesis and activity. *Redox Biology* 37, 101746.
406 doi:https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101746.
- 407 Štajn, A., Žikić, R. v, Ognjanović, B., Saičić, Z. S., Pavlović, S. Z., Kostić, M. M., et al. (1997).
408 Effect of Cadmium and Selenium on the Antioxidant Defense System in Rat Kidneys.
409 *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and*
410 *Endocrinology* 117, 167–172. doi:https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00063-7.

Running Title

- 411 Stuedter, M., Renko, K., Hög, A., and Schomburg, L. (2010). Selenium controls the sex-specific
412 immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice.
413 *Biochemical Journal* 429, 43–51. doi:10.1042/BJ20091868.
- 414 Sun, W., Zhu, J., Li, S., Tang, C., Zhao, Q., and Zhang, J. (2020). Selenium supplementation protects
415 against oxidative stress-induced cardiomyocyte cell cycle arrest through activation of
416 PI3K/AKT $\uparrow$. *Metallomics* 12, 1965–1978. doi:10.1039/d0mt00225a.
- 417 Takahashi, K., Suzuki, N., and Ogra, Y. (2017). Bioavailability Comparison of Nine
418 Bioselenocompounds In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci* 18, 506. doi:10.3390/ijms18030506.
- 419 Wang, Q., Sun, L., Liu, Y., Lu, J., Han, F., and Huang, Z. (2016). The Synergistic Effect of Serine
420 with Selenocompounds on the Expression of SelP and GPx in HepG2 Cells. *Biological Trace
421 Element Research* 173, 291–296. doi:10.1007/s12011-016-0665-8.
- 422 Wang, Y., Chen, H., Chang, W., Chen, R., Xu, S., and Tao, D. (2020). Protective effects of selenium
423 yeast against cadmium-induced necroptosis via inhibition of oxidative stress and MAPK
424 pathway in chicken liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206, 111329.
425 doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111329.
- 426 Zhang, C., Ge, J., Lv, M., Zhang, Q., Talukder, M., and Li, J.-L. (2020a). Selenium prevent
427 cadmium-induced hepatotoxicity through modulation of endoplasmic reticulum-resident
428 selenoproteins and attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Environmental Pollution* 260,
429 113873. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113873.
- 430 Zhang, C., Wang, L.-L., Cao, C.-Y., Li, N., Talukder, M., and Li, J.-L. (2020b). Selenium mitigates
431 cadmium-induced crosstalk between autophagy and endoplasmic reticulum stress via regulating
432 calcium homeostasis in avian leghorn male hepatoma (LMH) cells. *Environmental Pollution*
433 265, 114613. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114613.
- 434 Zhang, L., Yang, F., Li, Y., Cao, H., Huang, A., Zhuang, Y., et al. (2021). The protection of selenium
435 against cadmium-induced mitophagy via modulating nuclear xenobiotic receptors response and
436 oxidative stress in the liver of rabbits. *Environmental Pollution* 285, 117301.
437 doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117301.
- 438 Zwolak, I., and Zaporowska, H. (2012). Selenium interactions and toxicity: a review. *Cell Biology
439 and Toxicology* 28, 31–46. doi:10.1007/s10565-011-9203-9.

440

441 **Author Contributions**

442 TGB, FNR and JLGA conceived the idea. SRA and RP performed the experimental work. SRA and
443 TGB drafted the manuscript and SRA prepared the artworks. TGB and FNR supervised the whole
444 work. TGB acquired the funding and administrate the project. All the authors crucially revised the
445 manuscript for important intellectual content and approved the final version to be published.

446 **Funding**

Running Title

This work was supported by the projects PG2018-096608-B-C21 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO). S.R.A. thanks the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for a PhD scholarship (BES-2016-076364). The authors are grateful to FEDER (European Community) for financial support, Grant UNHU13-1E-1611.

FIGURES

Figure 1. Effect of SeMet (A) and Cd (B) on cell viability in HepG2 cells. Cells were exposed with the indicated concentrations of SeMet and CdCl₂ for 24h.

Figure 2. Effects of different concentration of CdCl₂ and/in combination with SeMet on cell viability in HepG2 cells. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3). (*): Significant differences between groups Cd15 and Cd15+Se; (#): Significant differences between groups Cd25 and Cd25+Se.

Figure 3. Chromatogram of selenoproteins obtained by 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS. Blue (Se group); Green (Cd5+Se group); Red (Cd15+Se group); Yellow (Cd25+Se group).

TABLES

Group	[Se] (μ M)		Absorption Se (%)	[Cd] (μ M)		Absorption Cd (%)
	Cells	Culture media		Cells	Culture media	
Control	0.052 $\pm$ 0.010	<LOD	-	<LOD	<LOD	-
Se	15.630 $\pm$ 0.157	75.559 $\pm$ 1.296	15.6	<LOD	<LOD	-
Cd5	0.033 $\pm$ 0.003	<LOD	-	3.851 $\pm$ 0.006	0.304 $\pm$ 0.012	77
Cd5 + Se	15.493 $\pm$ 0.220	82.040 $\pm$ 0.180	15.5	3.916 $\pm$ 0.061	0.294 $\pm$ 0.17	78.3
Cd15	0.032 $\pm$ 0.006	<LOD	-	8.404 $\pm$ 0.045	5.869 $\pm$ 0.173	56
Cd15 + Se	13.058 $\pm$ 0.376	90.565 $\pm$ 0.882	13.1	8.799 $\pm$ 0.316	6.451 $\pm$ 2.815	58.7
Cd25	0.041 $\pm$ 0.005	<LOD	-	8.569 $\pm$ 0.002	15.594 $\pm$ 0.424	34.3
Cd25 + Se	11.020 $\pm$ 0.311	84.138 $\pm$ 1.382	11	8.999 $\pm$ 0.199	15.694 $\pm$ 0.296	36

Table 1. Total Se and Cd content (μ M) in cell pellets and culture media expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3) and Cd and Se absorption percentage (%).

Group	GPx (μ g Se/g)	Se-metabolites (μ g Se/g)	SELENOP (μ g Se/g)	SeAlb (μ g Se/g)
Control	0.010 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.0005
Se	20.495 $\pm$ 2.067	16.378 $\pm$ 3.995	25.200 $\pm$ 0.065	3.041 $\pm$ 0.002
Cd5	0.010 $\pm$ 0.005	0.168 $\pm$ 0.003	0.043 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.0004
Cd5+Se	14.120 $\pm$ 0.827	4.889 $\pm$ 1.243	21.642 $\pm$ 1.085	2.6647 $\pm$ 0.8357
Cd15	0.019 $\pm$ 0.006	0.069 $\pm$ 0.001	0.028 $\pm$ 0.002	0.005 $\pm$ 0.001
Cd15+Se	10.392 $\pm$ 1.802	1.773 $\pm$ 0.351	13.405 $\pm$ 0.400	1.494 $\pm$ 0.100
Cd25	0.010 $\pm$ 0.001	0.035 $\pm$ 0.002	0.025 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.001
Cd25+Se	12.392 $\pm$ 0.150	2.269 $\pm$ 0.291	15.665 $\pm$ 0.894	2.749 $\pm$ 0.265

Table 2. Concentration of selenoproteins and selenometabolites in HepG2 cells.

Running Title

465

Comparison	Selenoproteins and Selenoespecies (µg Se/g)			
	GPx	Se-metabolites	SELENOP	SeAlb
Se vs Control	0.007	0.002	0.000	0.000
Cd5 vs Control	0.942	0.000	0.000	0.752
Cd15vs Control	0.062	0.000	0.479	0.486
Cd25vs Control	0.909	0.001	0.094	0.656
Cd5+Se vs Se	0.196	0.009	0.005	0.478
Cd15+Se vs Se	0.074	0.003	0.000	0.000
Cd25+Se vs Se	0.118	0.004	0.000	0.129

466

Table 3. *p*-values obtained for each comparison. Significance level $p < 0.05$

In review

Figure 1.JPEG

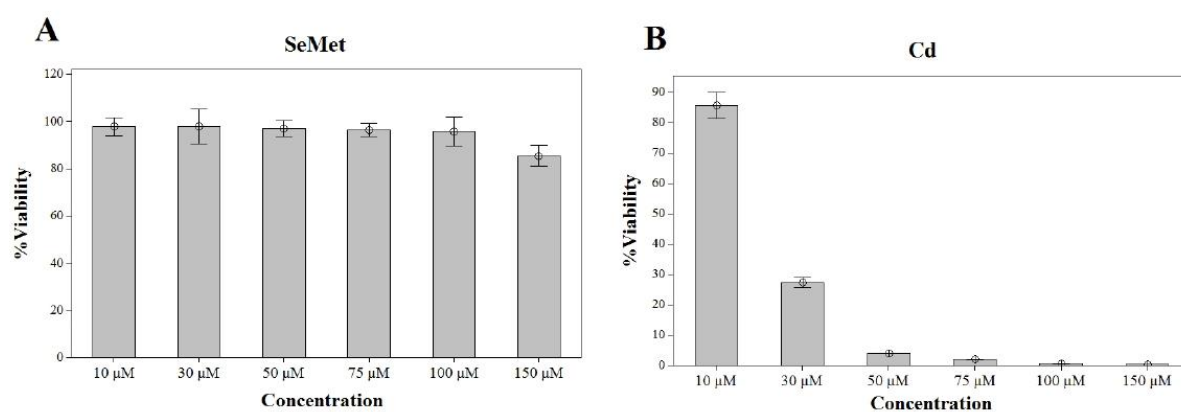


Figure 2.JPEG

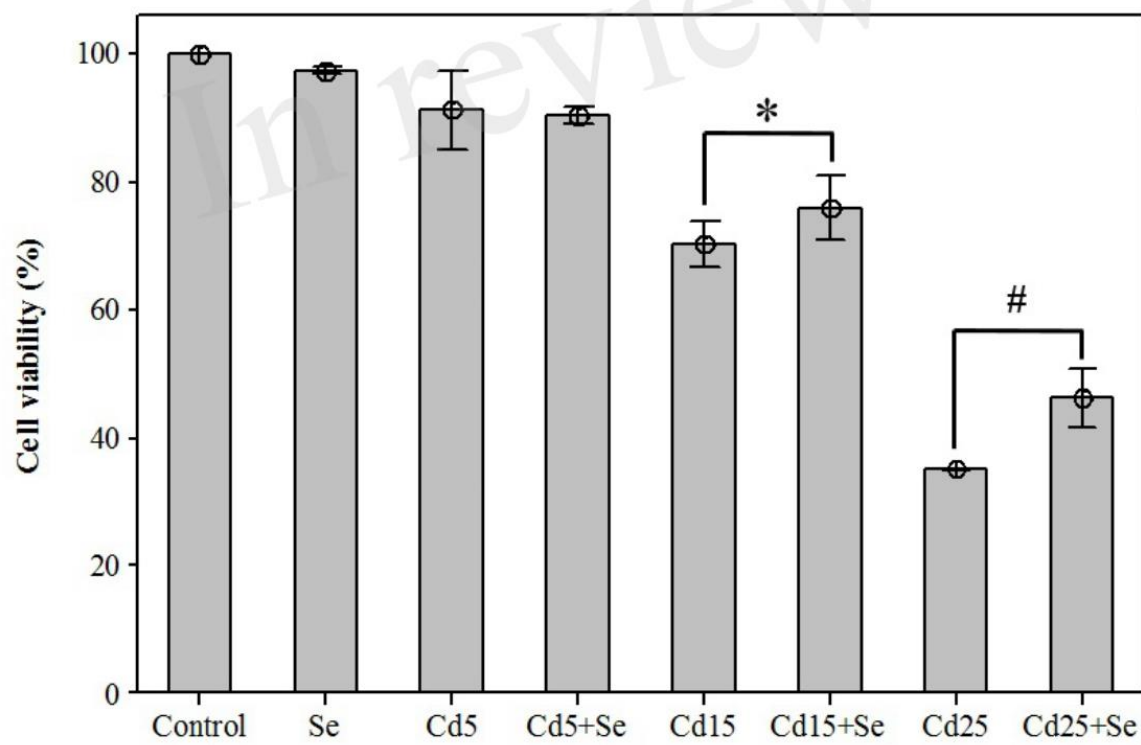
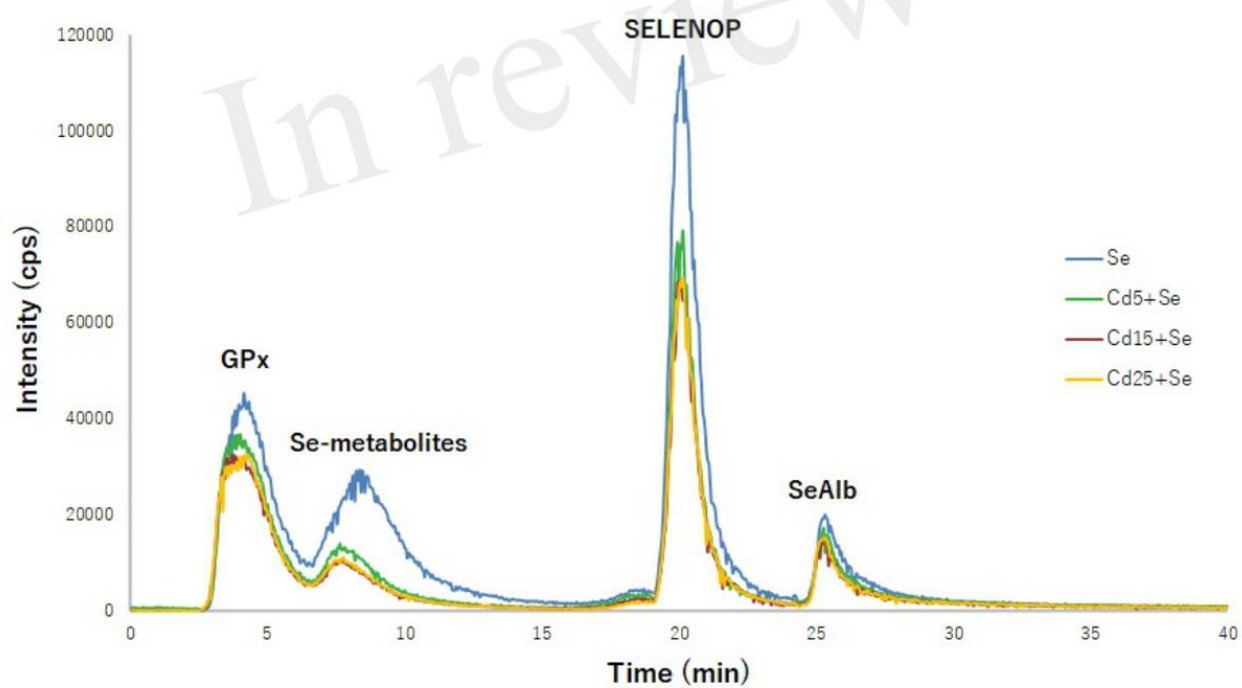


Figure 3.JPEG



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Antagonistic interaction of selenium and cadmium in human hepatic cells through selenoproteins

S. Ramírez-Acosta¹, R. Uhlírová², F. Navarro^{3*}, J.L. Gómez-Ariza¹, T. García-Barrera^{1*}

¹Research Center for Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA).

Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen, University
of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007, Huelva, Spain.

²Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Faculty of Chemistry,
Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic.

³Research Center for Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA).

Integrated Sciences, Cell Biology, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen,
University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007, Huelva, Spain.

TABLES

ICP-MS operational conditions		Chromatographic conditions	
Forward power	1550 W	Flow rate	1.3 mL·min ⁻¹
Nebulizer	MicroMist	Mobile phase A	0.05 M ammonium acetate
Plasma gas flow rate	15 L·min ⁻¹	Mobile phase B	1.5 M ammonium acetate
Carrier gas flow rate	1.08 L·min ⁻¹	Gradient	0-12 min 0% B
Reaction gases	40% O ₂ , H ₂		12-25 min 100% B
Sampling and skimmer cones	Ni		25-40 min 0%B
Sampling depth	10 mm	Valve position	position 1 (0-20 min)
Isotopes monitored	⁷⁴ Se, ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se ¹⁰³ Rh, ¹¹¹ Cd		position 2 (20-24 min)
Integration time	0.3 s		position 1 (24-40 min)

Table S1. Operational conditions for speciation of selenoproteins and total metal content.

BCR-274 Single Cell Protein certified reference material		
Element	<i>Obtained value (μg/g)</i>	<i>Certified value (μg/g)</i>
Se	1.07 ± 0.04	1.03 ± 0.05
Cd	0.031 ± 0.004	0.03 ± 0.002

Table S2. Certified and obtained values of BCR-274 reference material using the methodology proposed.

Comparison	Cd total content (μM)		Se total content (μM)	
	<i>Cells</i>	<i>Culture media</i>	<i>Cells</i>	<i>Culture media</i>
Se vs Control	-	-	0.000	0.000
Cd5+Se vs Cd5	0.243	0.268	0.430	0.001
Cd15+Se vs Cd15	0.014	0.005	0.000	0.000
Cd25+Se vs Cd25	0.020	0.878	0.000	0.002

Table S3. *p*-values for the different comparisons of total Cd and Se content in HepG2 cells and culture media.

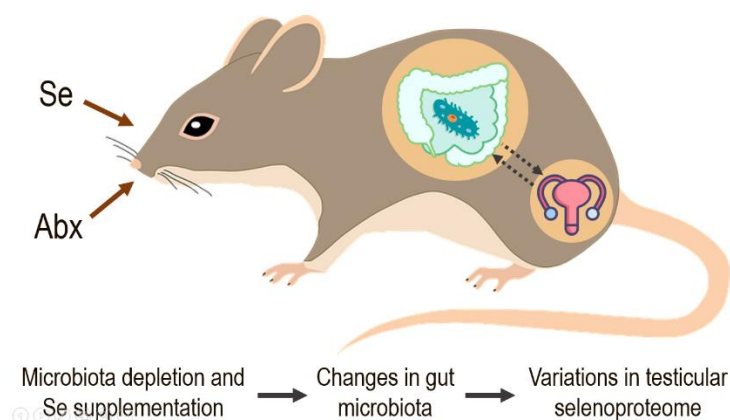
Capítulo II

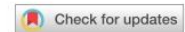
Chapter II

Influencia de la suplementación de selenio en selenoproteínas testiculares de ratón modulado por la microbiota intestinal

“Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota”

Ramírez-Acosta, S., Selma-Royo, M., Collado, M.C. *et al.* Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota. *Scientific Reports* **12**, 4218 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08121-3>





OPEN

Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota

Sara Ramírez-Acosta¹, Marta Selma-Royo², María Carmen Collado^{2,5}, Francisco Navarro-Roldán^{3,5}, Nieves Abril^{4,5} & Tamara García-Barrera^{1,5}✉

Selenium is a well-known essential element with important roles in human reproductive health mainly due to its antioxidant character. This study aimed to investigate the potential role of selenoproteins on gut microbiota and male reproductive health. A new assay for the absolute quantification of selenoproteins in testicular tissue based on two dimensional chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry was performed for the first time. The gut microbiota profile was obtained by 16S rRNA gene sequencing. Numerous associations were found between testicular selenoproteins and gut microbiota (e.g. *Mucispirillum*, related with sperm activity and testosterone, was associated with glutathione peroxidase (GPx) and selenoalbumin (SeAlb), while *Escherichia/Shigella*, related to sex hormones, correlated with GPx, selenoprotein P (SeLP) and SeAlb). The effects of Se-supplementation on testicular selenoproteins only occur in conventional mice, suggesting a potential selenoproteins-microbiota interplay that underlies testicular function. The selenoproteins GPx and SeLP have been quantified for the first time in the testicles, and the novel identification of SeAlb, a protein with nonspecifically incorporated Se, is also reported. These findings demonstrate the significant impact of Se-supplementation on gut microbiota and male reproductive health. In addition, the analytical methodology applied here in selenoprotein quantification in testicular tissue opens new possibilities to evaluate their role in gut microbiota and reproductive health axis.

Selenium (Se) is an essential trace element with important roles in immune function, the metabolism of thyroid hormones¹ and cancer chemoprevention². Se deficiency has been related to heart failure, nutritional myodegeneration (white muscle disease)³ and Keshan disease⁴ among other pathologies. Se dietary supplementation leads to the formation of specific selenoproteins, in which Se occupies the active center; hence, influencing the redox-regulated genes and helping the cell to convert with reactive oxygen species (ROS) into less reactive molecules⁵. Se is also important in reproductive health⁶, being essential for gonadal development, gametogenesis and fertilization⁷, likely as a result of its ability to modulate antioxidant defense mechanisms and redox sensitive pathways. There is clear evidence that a deficiency of Se and selenoproteins can lead to several reproductive health and obstetric complications as well as infertility, preeclampsia, miscarriage, preterm labor, fetal growth restriction, gestational diabetes and obstetric cholestasis⁶. Mammalian Se-containing proteins can be divided into three groups: (1) proteins containing non-specifically incorporated Se, in which sulfur is replaced by Se in amino acids such as methionine (SeMet) (e.g. selenoalbumin (SeAlb), which is not considered as a “real” selenoprotein), (2) specific Se-binding proteins (e.g. Se-binding protein 1, SBP1), in which Se is tightly associated with a cysteine (Cys) residue in the peptide but not as a component of selenocysteine (SeCys) and (iii) specific selenocysteine-containing selenoproteins (e.g. selenoprotein P (SELENOP))⁸. The role of Se in mammal

¹Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Research Center of Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA), Campus El Carmen, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007 Huelva, Spain. ²Department of Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology-National Research Council (IATA-CSIC), Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain. ³Department of Integrated Sciences, Cell Biology, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Huelva, Spain. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071 Córdoba, Spain. ⁵These authors jointly supervised this work: María Carmen Collado, Francisco Navarro-Roldán, Nieves Abril and Tamara García-Barrera. ✉email: tamara@dqcm.uhu.es

spermatogenesis is mainly mediated by two selenoproteins, namely phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx/GPx4) related to sperm quality and male fertility and SELENOP, a plasma protein required for Se supply to the gonads where it is used as a reservoir of Se⁹. Other selenoprotein transcripts (~ tenfold lower level than PHGPx and the majority of them with unknown function) have also been identified in male gonads (Thioredoxin/Glutathione Reductase (TGR), selenoprotein V, selenoprotein W, selenoprotein K, selenoproteins 15 and selenoprotein S)⁹.

Recent studies have pointed out the potential role of dietary Se in shaping the gut microbiota and, subsequently, exerting effects on host metabolism and immunity^{10–13}. Diet is considered a key regulator of gut microbiota with effects at local and systemic levels^{14,15} and also, on reproductive hormones levels¹⁶. Several reports have shown that high-fat diet induced gut dysbiosis can affect the system's health even causing neurological disorders^{17,18} and spermatogenesis impairments¹⁹. Recent studies suggest the impact of gut microbiota on fertility and reproductive health in both, males and females^{20–22}. However, little is known about the mechanisms underlying the shifts in gut microbiota across reproductive states. An increase in dietary Se intake has also been implicated in enhancing the antioxidant GPX activity, thereby improving male fertility²³. The encouraging results in the last years suggest that the combination of Se with other essential micronutrients may improve reproductive efficiency in males²³. However, to date there is not sufficient nor consistent findings upon which to draw solid conclusions. Indeed, previous studies regarding selenoproteins in the testicles applied non quantitative methods, such as transcriptomics or enzymatic assays⁹.

The aim of this work is to investigate the potential role of selenoproteins in the gut microbiota-reproductive health axis. For this purpose, the absolute quantification of selenoproteins by intact protein analysis will be performed using a metallomic approach based on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), a methodology used for analyses of serum, plasma²⁴ and the liver²⁵. To this end, mice testicular selenoproteome has been determined after Se-supplementation of conventional mice and mice with microbiota depleted by antibiotics. The total metal content in testicles has been also measured to evaluate the possible impact of Se-supplementation and microbiota on the homeostasis of elements in testicles, as well as their traffic.

Results and discussion

Preliminary observations and histopathology evaluation. This study analyzed the impact and effect of a Se-enriched diet on selenoproteins, total Se concentration and metal homeostasis in the testes for 8 week-old male *Mus musculus* mice as well as the relationships of these parameters with the gut microbiota composition. To study the influence on the gut microbiota, half of the mice received a cocktail of antibiotics (200 mg kg⁻¹ per body weight (bw) of ampicillin, neomycin and metronidazole, 100 mg kg⁻¹ bw of vancomycin and 2 mg kg⁻¹ bw of amphotericin B)²⁶ for one week, they were later fed with either a regular or a Se-supplemented diet for a further weeks. The Se-enriched diet provided the mice with a daily intake of 120 µg kg⁻¹ bw, three times the regular mouse intake of Se²⁷. This dose of Se is no-toxic, but able to modify some biological parameters²⁸. The animals showed no external evidence of illness or discomfort, and all survived the treatment. No differences were found between the body weights of the mice at the end of the treatment. However, pretreatment with Abx caused a decrease in the testicular weight of mice (Fig. S2), albeit statistically non-significant one.

Studies in animal models clearly demonstrate the deleterious effects of antibiotics on testicular function²⁹. The antibiotic cocktail we used here to deplete the intestinal microbiota included the aminoglycoside neomycin, an antibiotic that adversely affects spermatogenesis by cessation of meiosis at the level of primary spermatocytes³⁰. Our histopathological study confirms this effect (Fig. 1), as we found a greater number of spermatogonia, the diploid undifferentiated germ cells, in the seminiferous tubules of the Abx group. Although the differences between the Abx group and the control group were not statistically significant, these results suggest a possible arrest of the cell division processes that convert spermatogonia into spermatozoa. The Abx group's histological samples also showed an alteration of the normal structure of the seminiferous tubes with mild and punctual degenerative changes at the level of the basement membrane. This morphological layout is essential for the process of spermatogenesis since it is the structural and hormonal support of the spermatogonia in the different stages of the seminiferous epithelial cycle³¹ and abnormal basement membrane structures have been associated with spermatogenesis³². Although no significant decrease in the number of sperm per seminiferous tube was observed in any sample, our data suggests that Abx treatment may alter male fertility. The intake of a Se supplement after pretreatment with Abx (Abx-Se group) did not completely prevent the effect of Abx on the meiotic process but prevented the basement membrane abnormalities observed in the Abx group. These results suggest that Se supplementation likely improves the fertility of mice, in agreement with previous reports⁹.

Selenoproteins and total selenium in testicles. Selenoprotein extraction protocols from mammalian tissues requires high efficiency, avoiding interferences and protein degradation during the procedure. For total protein extraction we used here the CellLytic™ MT extraction reagent for total protein extraction, which contains a low concentration of a dialyzable mild detergent for minimal interference with protein interactions and biological activity³³. Selenoproteins obtained from mice testicles from each study group were clearly identified in the typical mass flow chromatogram (Fig. 2). These chromatograms represent the mass of Se (µg) vs time (min), and, thus, they do not reflect the abundance of different selenoproteins, but the Se accounted for by each one. When converting chromatograms peaks to selenoproteins abundance, it must be taken into consideration that both mice and human SELENOP contains 10 selenocysteine molecules (C₃H₇NO₂Se)³⁴, while GPx has 4 g atoms of Se per mole³⁵. In addition, we quantified SeAlb, which is not a "real selenoprotein", but a protein that incorporates Se post-translationally in the form of selenomethionine (SeMet)³⁶. Furthermore, the relative concentration of selenoprotein (in terms of Se) in the testicles is SELENOP > GPx + unretained (unr) ~ SeAlb (Fig. 2). It is noteworthy that GPx elutes in the void of the column and this peak should be assigned to GPx and

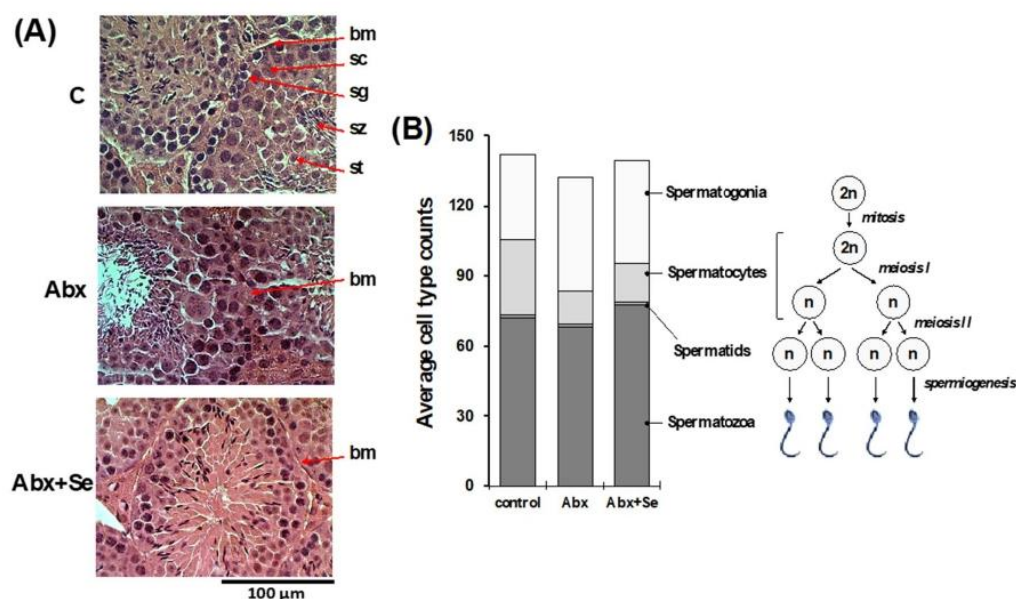


Figure 1. (A) Photomicrograph showing the cross section of H&E staining of the testes of a representative mouse from groups Control, C-Se, Abx and Abx + Se. The basement membrane (bm), spermatogonia cells (sg), spermatocytes (sc), spermatids (st) and spermatozoa (sz) are indicated by arrows. (400× magnification). (B) Bar plots showing the average counts for each germ cell type in the seminiferous tubule; the scheme illustrates the process of generation of the different types of germ cells during spermatogenesis.

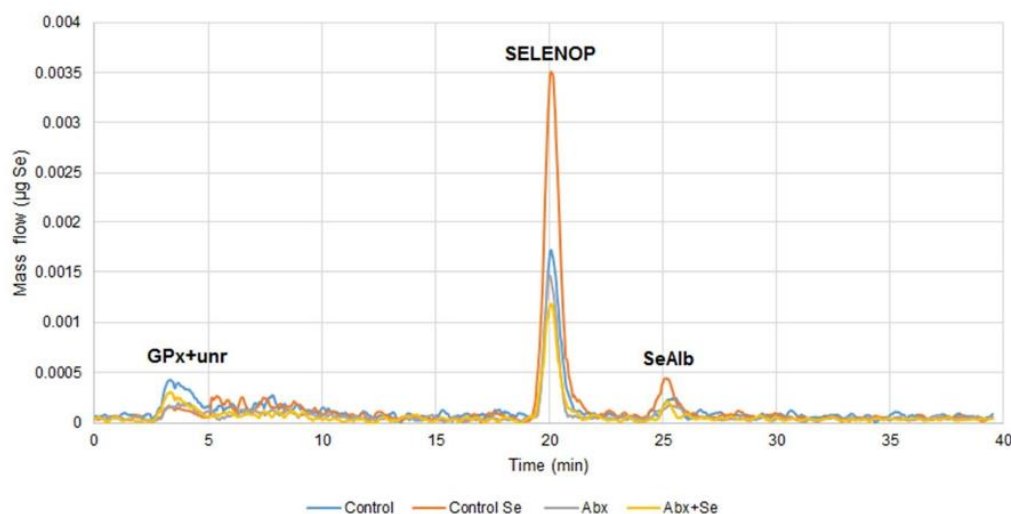


Figure 2. Selenium mass flow chromatogram obtained from testicular tissues of mice.

other unretained selenoproteins (they have not been identified in mice testicles by organic mass spectrometry and will be the object of future work).

Significant changes in both selenoprotein and total Se concentrations were observed between groups (Fig. 3 and Table S1). The total Se content in the testicles is affected by Se-supplementation. In conventional mice fed with a Se-supplemented diet (C-Se group), the total Se content was similar to the control group, and there were no statistical differences between groups. In contrast, mice fed Se-supplemented diet after microbiota depletion (Abx + Se group) presented the highest concentrations of Se in the testicles, showing statistical differences with the control group (C, 1.24-fold $\uparrow$, $p=0.01$), with the Se-supplemented conventional mice (C-Se, 1.19-fold $\uparrow$, $p=0.005$) and with the microbiota-depleted mice that were fed a rodent diet (Abx, 1.15-fold $\uparrow$, $p=0.01$).

Regarding selenoproteins, the concentrations of SELENOP and SeAlb were highest in the testicles of conventional mice fed a Se-supplemented diet, while the concentration of GPx + unr was the lowest in this group.

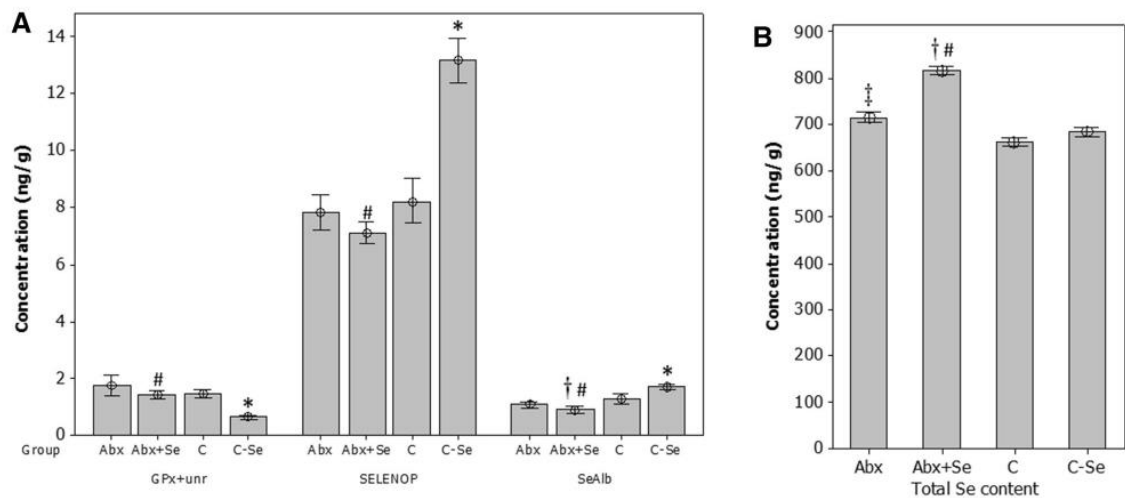


Figure 3. Selenoproteins (A) and total Se concentration (B) in the mouse testis. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 10$). (*) Statistically different in C-Se vs C comparison. (†) Statistically different in Abx + Se vs C comparison. (#) Statistically different in Abx + Se vs C-Se comparison. (‡) Statistically different in Abx + Se vs Abx comparison.

Thus, Se supplementation increases the concentration of SELENOP (1.61-fold $\uparrow$, $p = 0.000$) and SeAlb (1.30-fold $\uparrow$, $p = 0.013$) in the testicles of conventional mice (C-Se vs C), while decreasing the concentration of GPx + unr (2.32-fold $\downarrow$, $p = 0.000$). The SeAlb concentration in the testicles was significantly different between Abx + Se and C groups (1.54-fold $\downarrow$, $p = 0.017$). Se-supplementation of microbiota depleted mice (Abx + Se vs C-Se) increased the concentration of GPx + unr in testicles (2.22-fold $\uparrow$, $p = 0.000$) and decreased that of SELENOP (1.85-fold $\downarrow$, $p = 0.000$) and SeAlb (2.00-fold $\downarrow$, $p = 0.000$). As mentioned in a previous study PHGPx/GPx4 (most abundant) and SELENOP have been previously identified in testicles along with other proteins with unknown function or lower abundance⁸. However, to our knowledge, this is the first identification of SeAlb in the testicles, likely due to either the methodologies previously used (transcriptomics and enzymatic activities^{37,38} or a lack of information about its presence and role in the testicles. Testosterone is produced by the Leydig cell and secreted into the interstitial fluid from where it is taken up by the Sertoli or diffuses into the interstitial capillaries to bind to albumin for transport through the body. If the presence of Se in albumin favors testosterone binding and distribution to other organs and tissues, this is an interesting issue to be addressed in further studies. In addition, the absolute quantification of selenoproteins in the testicles has not been reported before. Moreover, the selenoproteins determined in this work accounts for the highest Se content linked to proteins in the testicles as concluded from the mass flow chromatogram (Fig. 2). Selenometabolites (SeO_4^{2-} , SeO_3^{2-} , SeMet, SeCys, SeMetSeCys) that elute between GPx and SELENOP were under the detection limits in all analyzed samples ($\text{LD} = 0.5 \text{ ng g}^{-1}$).

Thus, we suggest that Se-supplementation in conventional mice influences the selenoproteome, but not the total concentration of Se in the testicles (Fig. 3). Indeed, SELENOP and SeAlb patterns are parallel, as they both increase in concentration after Se-supplementation. However, the concentration of GPx + unr decreased in the testicles in Se-supplemented conventional mice. Nevertheless, Se-supplementation of microbiota-depleted mice (Abx + Se vs. Abx) has no effect on the testicular selenoproteome, but the total concentration of Se is significantly increased. These findings suggest that the effect of Se-supplementation on the selenoproteome of the testicles could be influenced and mediated by microbiota although the exact mechanisms remain unknown.

Se-supplementation has proven the beneficial effects of Se in male fertility reproduction and testicular damage^{23,39–41}. The main function of SELENOP is the transport and distribution of Se to other tissues, but it also possesses antioxidant action and it is involved in Se homeostasis⁴², while the GPx family are antioxidant selenoproteins⁴³ and SeAlb is a Se transporter⁴⁴. In the testicles, SELENOP is located in the Leydig cells⁴⁵ and can influence sperm quality and, hence, male fertility^{38,46}. PHGPx/GPx4 has also been related to sperm midpiece, mitochondrial sheath and sperm chromatin condensation⁸.

In previous work, the expression levels of GPx and SELENOP in the testicles of mice were not affected with dietary Se deficiency or excess selenomethionine⁴⁷, however, in rats with Se deficiency the expression levels of SELENOP were decreased³⁷. Other authors reported that Se-supplementation sharply increase the activity of testicular SELENOP⁴⁶ and, in studies of co-exposure to Cd and Se, Se ameliorates the effects of Cd by increasing SeP and GPX4 gene expression⁴⁸. The results obtained from studies of Se-supplementation in human prostate adenocarcinoma cells (F-9 and Du-145 cells) revealed an increase in mRNA expression levels on the glutathione peroxidases GPX1, GPX2 and GPX3, SeS and SEP15, while some selenoproteins located in the testes, such as SeW and SeV changes slightly and the TRXR3 selenoprotein decreased sharply⁴⁹.

To summarize, our results suggest that the use of antibiotics (Abx) may affect the ability of the host to incorporate Se into SELENOP, which, as we have mentioned, may influence testicular activity and reproductive function, in good agreement with the above results.

Element	Control	C-Se	Abx	Abx + Se
Al	1337 ± 380	1239 ± 31	1196 ± 75	829 ± 54
V	9.3 ± 7.3	6.9 ± 0.2	4.5 ± 1.3	6.4 ± 0.2
Cr	65 ± 8	161 ± 4	33 ± 0.2	20 ± 6
Mn	467 ± 16	470 ± 3	448 ± 10	463 ± 1
Fe	31,843 ± 147	25,557 ± 44	28,281 ± 266	32,312 ± 96
Co	17.1 ± 6.7	13.8 ± 1.7	16.3 ± 1.7	21.6 ± 0.8
Cu	1702 ± 17	1429 ± 12	1426 ± 16	1482 ± 30
Zn	3815 ± 31	3662 ± 2	3723 ± 1	4143 ± 42
As	15.4 ± 1.6	40.2 ± 2.7	2.9 ± 1.1	2.4 ± 0.7
Mo	63 ± 4	54 ± 3	130 ± 4	68 ± 1

Table 1. Concentration of elements (ng g⁻¹) expressed as mean ± SD (n = 3) in mice testicles from the different groups.

Metals and metalloids are very important in biology since as one-third of all proteins in the human body require a metal cofactor for functionality⁵⁰. Metallomics can be defined as the research field that elucidates the identification, distribution, dynamics, role and impact of metals and metalloids in biological systems^{51,52}. The methodology for a metallomic analysis usually involve the use of an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) hyphenated to high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC-MS) or capillary electrophoresis (CE)) using the heteroelement (an atom different to C, H, N, O or F, e.g. Se) in the biomolecule as a “tag” (heteroatom-tagged proteomics)⁵³. Thus, this approach, is more sensitive than the typical proteomic approaches which involve tryptic digestion and further analysis of peptides that are usually difficult to separate and it has not been previously applied for the absolute quantification of selenoproteins in testicular tissue⁵⁴. Other techniques such as UV-Vis spectrophotometry allow determination of the total content of proteins or their activities, but not the absolute quantification of specific proteins.

Influence of selenium supplementation on testicular metal homeostasis. The concentration of toxic and essential metals (Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Mo, Cd, Sb, Tl, and Pb) has been determined in the testicles of mice from the different groups to evaluate the metal homeostasis. The results are presented in Table 1. The concentrations of Cd, Sb, Tl and Pb in the testicles were all below the limit of detection (0.02–0.05 ng g⁻¹) in all mice groups.

The statistical analysis showed numerous differences in the concentration of metals between groups. The significant differences for each comparison are summarized in Table S2. Se-supplementation of conventional mice (C-Se vs C) increased the levels of Cr ($p = 0.004$) and As ($p = 0.008$) and decreased the levels of Fe ($p = 0.000$), Cu ($p = 0.003$) and Zn ($p = 0.020$) in the testicles. The apparent paradox of Se increasing the As concentration in the testicles but contributing to As detoxification can be explained by the ability of Se to additionally increase the concentration of betaine in testicles, which sequester As in the non-toxic form of arsenobetaine⁵⁵. The toxicity of Cr is determined by its chemical form, Cr(III) is essential while Cr(VI) is carcinogenic⁵⁶. The effect of Se on metal homeostasis in the testicles was different after microbiota depletion. The concentration of Cr ($p = 0.023$), Cu ($p = 0.013$) and As ($p = 0.009$) were lower in the Abx + Se group when compared to the control group, while the concentration of Zn was higher ($p = 0.013$). However, when Abx + Se is compared with C-Se, the levels of Fe ($p = 0.000$), Co ($p = 0.028$), Zn ($p = 0.004$) and Mo ($p = 0.024$) increased and the levels of Al ($p = 0.012$), Cr ($p = 0.001$) and As ($p = 0.003$) decreased. Finally, Se-supplementation in microbiota depleted mice (Abx + Se vs Abx) reduces the concentrations of Al ($p = 0.031$) and Mo ($p = 0.003$) in the testicles whereas the concentration of Fe ($p = 0.002$) and Zn ($p = 0.005$) were augmented. The cytosol of most eukaryotic cells contains the enzyme superoxide dismutase (SOD), which contains Cu and Zn. After exposure to antibiotics, tissues are subjected to oxidative stress, which likely led to an increase in SOD and therefore, increased Zn levels^{57,58}.

Essential metals like Mn, Cu and Zn are crucial for maintaining male reproductive functions, as they are involved in spermatogenesis and sperm motility^{59,60}. Moreover, their interaction with toxic elements (As, Cd, Hg, Pb, and others) may change the toxicity of these metals⁶¹. The synergistic/antagonistic interactions between elements through metal traffic and homeostasis in the different organs and tissues have been reported⁶². The antagonistic role of Se has been proven with toxic elements such as Hg⁶³, Cd⁶⁴ and As⁶⁵ and also with organic pollutants⁶⁶.

Selenoproteins and Gut Microbiota. It is well-known that gut microbiota play important roles in host health, modulating physiological, immunological and metabolic functions, but they also participate in the regulation of hormones related to reproductive functions¹⁶ through the hypothalamic-pituitary-testicular axis⁶⁷. Recently, the subject of the effects of dietary and supplemented Se on gut microbiota has been receiving growing attention, but the interplay between testicular selenoproteins and microbiota has not been previously reported. As detailed elsewhere²⁸, Se-supplementation shape the gut microbiota composition as well as the effect of the antibiotics treatment (Fig. S3). In brief, Se-supplemented groups showed an increase in members of the *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families as well as *Christensenellaceae* family and *Lactobacillus* genus.

The microbial richness (Chao1 index) and diversity (Shannon index) indices were associated with selenoproteins in the testicles despite the impact of Abx on the microbial composition. In control group, higher microbial diversity ($R = 0.67, p \leq 0.05$) and richness ($R = 0.71, p \leq 0.05$) were associated with higher levels of SeAlb. In the Se-supplemented group, higher microbial diversity was also associated to SeAlb ($R = 0.81, p \leq 0.05$), but not with microbial richness. Furthermore, the relationship between SeAlb and microbial diversity disappear after the Abx treatment; with one exception: in the Abx + Se group, Chao1 index showed a positive association with SELENOP ($R = 0.64, p \leq 0.05$). These data suggest a potential effect of the microbiota on the specific selenoproteins in mice testes. To further explore the gut microbiota-testicular selenoproteome interplay, specific associations at the genus level in each group were determined (Fig. 4). The associations at phylum and family levels are detailed in Tables S3–S6.

As shown in Fig. 4, an elevated number of correlations between selenoproteins in the testicles and microbiota composition appeared after Se-supplementation of conventional mice (C-Se) and/or microbiota depleted mice (Abx + Se). It is also noteworthy that the correlations between total Se and SELENOP with microbiota were highly similar in the control mice, and always in the opposite manner than those of GPx + unr. Moreover, this behavior was dependent on the group/treatment. As previously discussed, these findings suggest that the effect of Se-supplementation on the selenoproteome of testicles is influenced by microbiota. In the control group, a higher total Se concentration was positively linked to several groups from the *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* families as well as the *Butyrivoccus* genus, all known as short chain fatty acids (SCFAs) producers with beneficial impacts on intestinal homeostasis and promoting health benefits. Furthermore, members from the *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families were also found to be associated with testicular functions⁶⁸. Indeed, after the supplementation with Se, some SCFA producers such as *Faecalibacterium* genus as well as *Lachnospiraceae_UCG001* were correlated with SELENOP and *Ruminococcaceae_UCG009* was correlated with SeAlb. Moreover, in the Abx group these correlations were lost and most of the relations between microbiota and selenoproteome components were found with the total Se and SeAlb (Tables S4–S7). However, in the Abx + Se group, several new associations between all components of selenoproteome were observed, including positive associations between previously mentioned families such as *Lachnospiraceae* groups and *Ruminococcus_1* with Total Se and SeAlb (Fig. 4). It is noteworthy that in the control group these bacteria correlated positively with total Se, while in Se-supplemented mice groups they correlated with specific selenoproteins such as *Mucispirillum*. This observation may indicate that Se-supplementation aids specific functions such as transport (SeAlb and SELENOP) or sperm quality and male fertility (SELENOP)^{38,46}.

A higher relative abundance of the *Mucispirillum* genus was associated with higher total Se content in the control group. However, after Se-supplementation, higher relative abundance of this genus was associated with lower GPx + unr and higher SeAlb concentrations in the testicular tissue of conventional mice. A decrease in the level of this genus in mice fed with supranutritional Se has been previously reported⁶⁹. Other authors indicated numerous associations between bacterial taxa and testicular function, but specially showed that *Mucispirillum* were positively correlated with testosterone and sperm activity⁶⁸. *Escherichia/Shigella* has been related with sex hormones in the reproductive endocrine system⁷⁰. This genus correlated positively with SELENOP and negatively with total Se in conventional mice after Se supplementation, while correlating positively with SeAlb in the Abx group. After Se supplementation of this group (Abx + Se), *Escherichia/Shigella* correlated positively with GPx + unr and SELENOP, and negatively with SeAlb.

In summary, Se-supplementation has an impact on the selenoproteome and mineral homeostasis in the testes, and also, on the gut microbiota, suggesting a pivotal key interplay between Se-microbiota and male reproductive health. The metallomic analytical approach, based on the quantification of selenoproteins using an atomic spectrometric detector such as ICP-MS coupled to HPLC, allowed for the first time the absolute quantification of the selenoproteins containing most of the bonded Se in the testicles as well as the novel identification of SeAlb in testicles. Our data indicate that Se-supplementation of conventional mice did not change the total level of Se in the testicles, but significantly changed the selenoproteome profile. Moreover, the opposite situation was observed in microbiota depleted mice suggesting that the effect of Se-supplementation on the selenoproteome of the testicles could be influenced by microbiota. Specific associations between selenoproteins in the testicles and gut microbiota composition and diversity have been observed, some of them related to sperm activity and sex hormones, demonstrating the interplay of Se supplementation with microbiota and the impact on reproductive health. More studies are needed to ascertain the mechanisms behind the Se-microbiota-reproductive health.

Materials and methods

Animal experimental design. After a three day acclimation period, forty mice (male *Mus musculus* BALB/c, 8 weeks old) were randomly divided into two groups, one receiving water and the other, receiving water with a mixture of antibiotics (ampicillin 1%, metronidazole 1%, neomycin 1%, vancomycin 0.5%) and an antifungal (amphotericin B, 10 mg/L) for one week. After this pretreatment time, half of the mice in each group ($n = 10$) were fed for an additional two weeks (treatment period) with the same regular diet used in the previous days, and the other half, were fed with a Se-enriched diet (0.65 mg/kg of sodium selenite). The four groups, C (control), C-Se (Se-enriched diet during treatment); Abx (antibiotics in the water during pretreatment) and Abx + Se (Antibiotics in the water during pretreatment and Se-enriched diet during treatment) were caged in pairs, with free access to water and food, which were changed every other day. Figure S1 summarizes the design of the experiment. At the end of the experiment, mice were anesthetized (isoflurane) and sacrificed by cervical dislocation, and organs were immediately removed, cleaned in NaCl (0.9% w/w) solution, cryo-homogenized in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

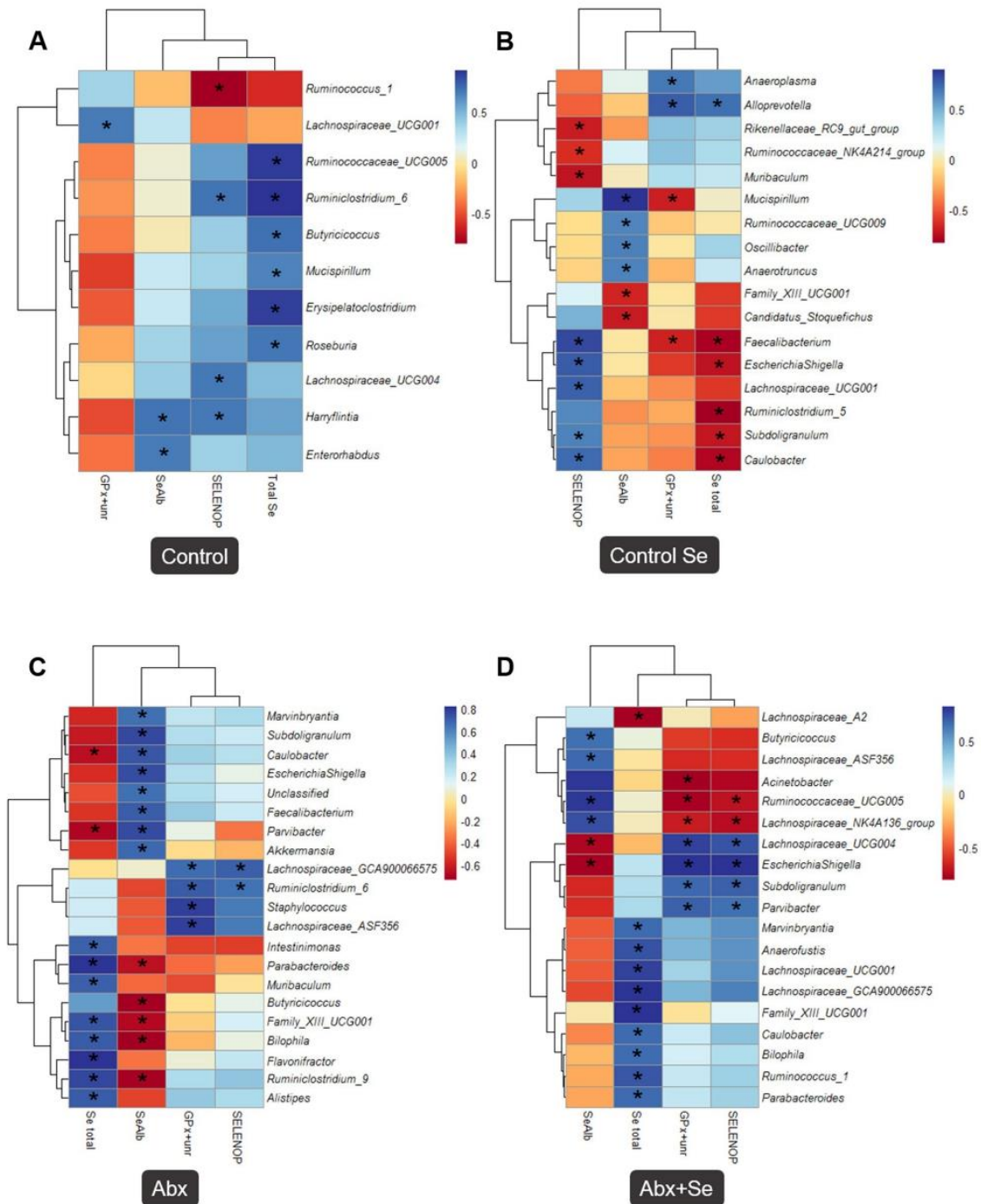


Figure 4. Heatmap showing the correlations between the testicular selenoproteome, total Se content and gut microbiota composition at genus level in the groups: Control (A), C-Se (B), Abx (C), Abx + Se (D). The colors range from blue (positive correlation) to red (negative correlation) and (*) indicates a p -value ≤ 0.05 .

Ethics statement. The experimental procedures were carried out at the Animal Experimentation Service of the University of Cordoba (SAEX-UCO), after approval by the bioethics committee of the university and the regional government (Code Num. 02-01-2019-001), in accordance with current European Union regulations. Furthermore, the study was carried out in compliance with the ARRIVE Guideline.

Histopathological evaluation. Testicle tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h and then embedded in paraffin wax. 4 µm-thick paraffin serial sections were obtained using a rotary microtome (SAKURA Tissue Tek Accu Cut SRM 119 200) and stained with hematoxylin–eosin according to routine protocols. Photomicrographs were obtained with a Nikon Eclipse E400 photomicroscope at 400 magnifications.

Speciation of selenoproteins in mice testicles. To isolate selenoproteins, testicles were cryo-homogenized with a mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen. Selenoproteins were extracted using the Cel-Lytic™ MT extraction reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (3 Ml g⁻¹) into a glass/teflon homogenizer at 4 °C. Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was added to CelLytic MT reagent to avoid protein degradation. Then, the mixture was centrifuged at 15,500g for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected and filtered through low protein absorption Iso-Disc poly(vinylidene difluoride) filters (PVDF, 25 mm diameter, 0.45 µm pore size). A preconcentration step is necessary due to the low concentration of selenospecies. To this end, the extracts were completely evaporated under a nitrogen stream and re-dissolved in 0.1 mL of MilliQ water prior to the analysis.

Selenoproteins were separated from the obtained extracts using a previously described method⁷¹. Briefly, the chromatographic separation of GPx, SELENOP and SeAlb was performed with an ultra-high performance liquid chromatograph (model 1260 Infinity Quaternary LC, Agilent Technologies) using two size exclusion columns (5 ml HiTrap®Desalting Columns, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and two different affinity chromatography columns (AFC, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) with stationary phases of heparine-sepharose column (HEP-HP) and blue-sepharose column (BLUE-HP). The HEP-HP column retains only SELENOP, while the BLUE-HP column retains SELENOP and SeAlb. The column switching method allows the simultaneous separation of selenoproteins and selenometabolites: GPx and selenometabolites elute when the column switching system is in position 1 (0–20 min), while SELENOP and SeAlb are retained in the AFC columns. The valve switches to position 2 (20–24 min) to elute the SELENOP, and then returns to position 1 for the elution of SeAlb. Polyether ether ketone (PEEK) tubing (30 cm × 0.6 mm i.d.) and a T-connector were used to connect the eluent of the chromatograph to the Micromist nebulizer (Glass Expansion, Switzerland) of the triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-QQQ-MS, model Agilent 8800 Triple Quad, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) (2D-SEC-SEC-AFSeAF-ICP-MS)⁷⁴. Se (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) was also introduced into the system via a T-connector for isotope dilution analysis. The absolute quantification of selenoproteins by 2D-SEC-AF-SUID-ICP-MS was carried out using the operational conditions as summarized in Table S7.

Total elements determination in mice testicles. For total elemental analysis, testicular tissue samples from mice in each group were pooled, and approximately, 0.1000 g of sample were digested in a microwave reaction system MARS 6 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) with a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide (4:1, v/v). The mineralization was carried out from room temperature to 160 °C over 15 min, then maintaining at 400 W for 40 min. Then, the samples were diluted fivefold in 5% HNO₃ containing 100 µg L⁻¹ of rhodium, and filtered using 0.45 µm PTFE syringe filters prior to the analysis by ICP-QQQ-MS. The operational conditions for ICP-QQQ-MS are listed in Table S7. The validation of the methodology was carried out using a fish protein certified reference material for trace element DORM-4 (National Research Council of Canada) (Table S8).

Gut microbiota analysis. Fecal samples were collected from the colon and immediately frozen in liquid nitrogen. DNA from fecal samples (approx. 100 mg) was obtained with the MasterPure DNA extraction kit (Epicentre, Madison, WI, United States) following the manufacturer's instructions. Specific modifications were included as described elsewhere⁷². DNA concentration was measured using a Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technology, Carlsbad, CA, United States). A specific 16S rRNA amplicon (V3-V4 variable region of the 16S rRNA gene) was amplified and sequenced following Illumina protocols. Briefly, a multiplexing step was conducted using the NextEra Index Kit (Illumina, San Diego, CA, United States) and amplicons were checked with a Bioanalyzer DNA 1000 chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States). Libraries were sequenced (2 × 300 bp paired-end run, MiSeq Reagent kit v3) on a MiSeq-Illumina platform (FISABIO sequencing service, Valencia, Spain). Controls (DNA extraction procedure and libraries amplification) were included. A DADA2 pipeline was used to achieve quality filtering, sequence joining and chimera removal⁷³. Taxonomy assignment was performed using Silva v132 database^{74,75}. Sample with less than 1000 reads as well as specific taxa present at levels less than 0.01% and those present less than 3 times in at least 20% of the samples were filtered and removed from the analysis. Furthermore, sequences classified as Chloroplast and Cyanobacteria were filtered from the final dataset as they are associated with potential contaminants.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Minitab16 Statistical Software (State College, PA, United States) and STATISTICA 8 Software. Firstly, Anderson–Darling normality test was used to determine whether or not data are normally distributed. Differences between groups were tested using the Kruskal–Wallis test (non-parametric statistics) and one-way ANOVA (parametric statistics). The Spearman correlation test was

performed for correlation analysis between gut microbiota abundance and selenoproteins concentrations. The level of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Heatmaps were generated in R Project software (version 4.0.2) (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). For the microbiota analyses, total sum normalization (TSS) for the statistical analysis, multivariate test and data mining were performed with Calypso web platform v. 8.56⁷⁶. Alpha-diversity metrics (Chao1 and Shannon indices) and beta diversity analysis (based on Bray Curtis distance) were obtained. Briefly, Permutational multivariate analysis of variance (ADONIS) and Redundancy Discriminant Analysis (RDA) were obtained. Relative abundance (%) differences between groups at different taxonomical levels were tested using the Kruskal-Wallis test with False discovery test rate (FDR) for multiple test correction. Alpha diversity indexes were obtained after a rarefaction to 93,525 sequences (minimum number of reads per sample). The level of statistical significance for all tests was fixed to $p < 0.05$.

Received: 20 September 2021; Accepted: 24 February 2022

Published online: 10 March 2022

References

- Winther, K. H., Rayman, M. P., Bonnema, S. J. & Hegedüs, L. Selenium in thyroid disorders—essential knowledge for clinicians. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 165–176 (2020).
- Lü, J. *et al.* Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges. *Nutr. Cancer* **68**, 1–17 (2016).
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R. & Hurst, R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1484S–1491S (2010).
- Rayman, M. P. Selenium and human health. *Lancet (London, England)* **379**, 1256–1268 (2012).
- Hugejiletu, H. *et al.* Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. *Biol. Trace Elem. Res.* **154**, 28–44 (2013).
- Mistry, H. D., Broughton Pipkin, E., Redman, C. W. G. & Poston, L. Selenium in reproductive health. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 21–30 (2012).
- Mirone, M., Giannetta, E. & Isidori, A. M. Selenium and reproductive function: A systematic review. *J. Endocrinol. Invest.* **36**, 28–36 (2013).
- Behne, D. & Kyriakopoulos, A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 453–473 (2001).
- Boitani, C. & Puglisi, R. Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Adv. Exp. Med. Biol.* **636**, 65–73 (2008).
- Derrien, M., Belzer, C. & de Vos, W. M. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb. Pathog.* **106**, 171–181 (2017).
- Plovier, H. *et al.* A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.* **23**, 107–113 (2017).
- Presley, L. L., Wei, B., Braun, J. & Borneman, J. Bacteria associated with immunoregulatory cells in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 936–941 (2010).
- Liu, W. *et al.* Diet- and Genetically-Induced Obesity Produces Alterations In The Microbiome, Inflammation and Wnt pathway in the intestine of Apc(+/-1638N) mice: Comparisons and contrasts. *J. Cancer* **7**, 1780–1790 (2016).
- Sherwin, E., Bordenstein, S. R., Quinn, J. L., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Microbiota and the social brain. *Science (80-.)*. **366**, eaar2016 (2019).
- Dowd, J. B. & Renson, A. 'Under the skin' and into the gut: Social epidemiology of the microbiome. *Curr. Epidemiol. Reports* **5**, 432–441 (2018).
- Hussain, T. *et al.* Relationship between gut microbiota and host-metabolism: Emphasis on hormones related to reproductive function. *Anim. Nutr.* **7**, 1–10 (2021).
- Moos, W. H. *et al.* Microbiota and neurological disorders: A gut feeling. *Biores. Open Access* **5**, 137–145 (2016).
- Wu, W. *et al.* Targeting gut microbiota dysbiosis: Potential intervention strategies for neurological disorders. *Engineering* **6**, 415–423 (2020).
- Ding, N. *et al.* Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. *Gut* **69**, 1608–1619 (2020).
- Zhang, C. *et al.* Rescue of male fertility following faecal microbiota transplantation from alginate oligosaccharide-dosed mice. *Gut* <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323593> (2020).
- Guo, L. *et al.* Gut microbiological disorders reduce semen utilization rate in duroc boars. *Front. Microbiol.* **11**, 2493 (2020).
- Komiya, S. *et al.* Characterizing the gut microbiota in females with infertility and preliminary results of a water-soluble dietary fiber intervention study. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **67**, 105–111 (2020).
- Qazi, I. H. *et al.* Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: a review of past and present evidences. *Antioxidants* **8**, (2019).
- García-Sevillano, M. A., García-Barrera, T. & Gómez-Ariza, J. L. Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. *J. Chromatogr. A* **1318**, 171–179 (2013).
- García-Sevillano, M. A., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., Navarro, F. & Gómez-Ariza, J. L. Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure: Effects on selenoprotein. *Chem. Biol. Interact.* **229**, 82–90 (2015).
- D'Amato, A. *et al.* Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome* **8**, 140 (2020).
- Raines, A. M. & Sunde, R. A. Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC Genomics* **12**, 26 (2011).
- Callejón-Leblic, B., Selma-Royo, M., Collado, M. C., Abril, N. & García-Barrera, T. Impact of antibiotic-induced depletion of gut microbiota and selenium supplementation on plasma selenoproteome and metal homeostasis in a mice model. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 7652–7662 (2021).
- Singh, V. J. & Sharma, S. Effect of antibiotic therapy on sperm quality. *Eur. J. Mol. Clin. Med.* **7**, 4398–4403 (2020).
- Samplaski, M. K. & Nangia, A. K. Adverse effects of common medications on male fertility. *Nat. Rev. Urol.* **12**, 401–413 (2015).
- Shetty, G. & Meistrich, M. L. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *JNCI Monogr.* **2005**, 36–39 (2005).
- Lehmann, D. *et al.* Role of immunological factors in male infertility Immunohistochemical and serological evidence. *Lab. Invest.* **57**, 21–28 (1987).

33. Raman, A. V. *et al.* Selenoprotein W expression and regulation in mouse brain and neurons. *Brain Behav.* **3**, 562–574 (2013).
34. Hill, K. E., Lloyd, R. S., Yang, J. G., Read, R. & Burk, R. F. The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* **266**, 10050–10053 (1991).
35. Flohe, L., Günzler, W. A. & Schock, H. H. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**, 132–134 (1973).
36. Rayman, M. P., Infante, H. G. & Sargent, M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. *Br. J. Nutr.* **100**, 238–253 (2008).
37. Wang, Q. *et al.* Low-Se Diet Can Affect Sperm Quality and Testicular Glutathione Peroxidase-4 activity in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **4**–10 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02515-y>.
38. Michaelis, M. *et al.* Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 905–910 (2014).
39. Ibrahim, H. A. M. *et al.* Selenium-enriched probiotics improves murine male fertility compromised by high fat diet. *Biol. Trace Elem. Res.* **147**, 251–260 (2012).
40. Moslemi, M. K. & Tavanbakhsh, S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int. J. Gen. Med.* **4**, 99–104 (2011).
41. Benvenega, S. *et al.* Effects of Myo-inositol alone and in combination with Seleno-Lmethionine on cadmium-induced testicular damage in mice. *Curr. Mol. Pharmacol.* **12**, 311–323 (2019).
42. Burk, R. F. & Hill, K. E. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1441–1447 (2009).
43. Björnstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B. & Holmgren, A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 29382–29384 (1994).
44. Suzuki, Y. *et al.* Selenium metabolism and excretion in mice after injection of (82)Se-enriched selenomethionine. *Metallomics* **5**, 445–452 (2013).
45. Nishimura, K. *et al.* Association of selenoprotein P with testosterone production in cultured Leydig cells. *Arch. Androl.* **47**, 67–76 (2001).
46. Zhou, J.-C. *et al.* Dietary selenium deficiency or excess reduces sperm quality and testicular mRNA abundance of nuclear glutathione peroxidase 4 in rats. *J. Nutr.* **147**, 1947–1953 (2017).
47. Akahoshi, N. *et al.* Dietary selenium deficiency or selenomethionine excess drastically alters organ selenium contents without altering the expression of most selenoproteins in mice. *J. Nutr. Biochem.* **69**, 120–129 (2019).
48. Messaoudi, I., Banni, M., Said, L., Said, K. & Kerkeni, A. Involvement of selenoprotein P and GPx4 gene expression in cadmium-induced testicular pathophysiology in rat. *Chem. Biol. Interact.* **188**, 94–101 (2010).
49. Kuznetsova, Y. P., Goltyshev, M. V., Gorbacheva, O. S. & Novoselov, S. V. Influence of Sodium Selenite on the mRNA Expression of the Mammalian Selenocysteine-Containing Protein Genes in Testicle and Prostate Cancer Cells. **480**, 131–134 (2018).
50. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L. & Thornton, J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 1205–1218 (2008).
51. Haraguchi, H. Metallomics as integrated biometal science. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 5–14 (2004).
52. Williams, R. J. P. Chemical selection of elements by cells. *Coord. Chem. Rev.* **216–217**, 583–595 (2001).
53. Sanz-Medel, A. 'Heteroatom-tagged' quantification of proteins via ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 5393–5395 (2016).
54. Calderón-Celis, F., Sanz-Medel, A. & Encinar, J. R. Universal absolute quantification of biomolecules using element mass spectrometry and generic standards. *Chem. Commun.* **54**, 904–907 (2018).
55. Fowler, B. A. & Jones, R. L. Chapter 19. (2007). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369413-3.50074-4>
56. Anderson, R. A. Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **26**, S35–S41 (1997).
57. Muller, F. L. *et al.* Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1993–2004 (2006).
58. Elchuri, S. *et al.* CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* **24**, 367–380 (2005).
59. Li, Y., Wu, J., Zhou, W. & Gao, E. Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in China. *BMC Public Health* **12**, 919 (2012).
60. Guzikowski, W., Szykowska, M. I., Motak-Pochrzest, H., Pawlaczyk, A. & Sypniewski, S. Trace elements in seminal plasma of men from infertile couples. *Arch. Med. Sci.* **11**, 591–598 (2015).
61. Goyer, R. A. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 37–50 (1997).
62. García-Barrera, T. *et al.* Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 2237–2253 (2012).
63. Li, X., Yin, D., Li, J. & Wang, R. Protective Effects of Selenium on Mercury Induced Immunotoxic Effects in Mice by Way of Concurrent Drinking Water Exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **67**, 104–114 (2014).
64. Rodríguez-Moro, G., Roldán, F. N., Baya-Arenas, R. & Arias-Borrego, A. Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. 1762–1775 (2020).
65. García-Sevillano, M. A., Jara-Biedma, R., González-Fernández, M., García-Barrera, T. & Gómez-Ariza, J. L. Metal interactions in mice under environmental stress. *Biomaterials* **26**, 651–666 (2013).
66. Ungvári, É. *et al.* Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **64**, 298–306 (2014).
67. Al-Asmakh, M. *et al.* The gut microbiota and developmental programming of the testis in mice. *PLoS One* **9**, e103809 (2014).
68. Tian, X. *et al.* Lactobacillus plantarum TW1-1 alleviates diethylhexylphthalate-induced testicular damage in mice by modulating gut microbiota and decreasing inflammation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1–16 (2019).
69. Zhai, Q. *et al.* Effects of dietary selenium supplementation on intestinal barrier and immune responses associated with its modulation of gut microbiota. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **5**, 724–730 (2018).
70. Xu, J. *et al.* Fertility factors affect the vaginal microbiome in women of reproductive age. *Am. J. Reprod. Immunol.* **83**, e13220 (2020).
71. Callejón-Leblic, B. *et al.* Absolute quantification of selenoproteins and selenometabolites in lung cancer human serum by column switching coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1619**, 460919 (2020).
72. Sanguinetti, E. *et al.* Microbiota signatures relating to reduced memory and exploratory behaviour in the offspring of overweight mothers in a murine model. *Sci. Rep.* **9**, 12609 (2019).
73. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
74. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, 590–596 (2013).
75. Yilmaz, P. *et al.* The SILVA and 'All-species Living Tree Project (LTP)' taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* **42**, D643–D648 (2014).
76. Zakrzewski, M. *et al.* Calypso: a user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics* **33**, 782–783 (2017).

Author contributions

S.R.A.: formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization. M.S.R.: formal analysis, investigation, data curation, software, writing—review and editing, visualization. M.C.C.: conceptualization, methodology, resources, supervision, writing—reviewing and editing. F.N.R.: conceptualization, investigation, writing—review and editing. N.A.: conceptualization, methodology, data curation, writing—original draft, writing—review and editing. T.G.B.: conceptualization, methodology, resources, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, supervision, funding acquisition.

Funding

This article was funded by the projects PGC 2018- 096608-B-C21 from the Spanish Ministry of Science and innovation (MCI) (Generación del Conocimiento. MCI/AEI/FEDER, EU “Una manera de hacer Europa”) and UHU-1256905 from the FEDER Andalusian Operative Program 2014-2020 (Ministry of Economy, Knowledge, Business and Universities, Regional Government of Andalusia, Spain). S.R.A. thanks the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for a PhD scholarship (BES-2016-076364). The authors are grateful to FEDER (European Community) for financial support, Grant UNHU13-1E-1611. The authors would like to acknowledge the support from The Ramón Areces Foundation (ref. CIVP19A5918).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08121-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to T.G.-B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

SUPPORTING INFORMATION

Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota

**Sara Ramírez-Acosta¹, Marta Selma-Royo², María C. Collado^{Σ2}, Francisco Navarro Roldán^{Σ3},
Nieves Abril^{Σ4}, Tamara García-Barrera^{Σ1*}**

¹Research Center of Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA). Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Campus El Carmen, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007, Huelva, Spain

²Institute of Agrochemistry and Food Technology-National Research Council (IATA-CSIC), Department of Biotechnology, Agustín Escardino 7. 46980 Paterna, Valencia, Spain

³Department of Integrated Sciences, Cell Biology, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Spain

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, E-14071, Córdoba, Spain.

*tamara@dqcm.uhu.es

^ΣSenior authors

FIGURES

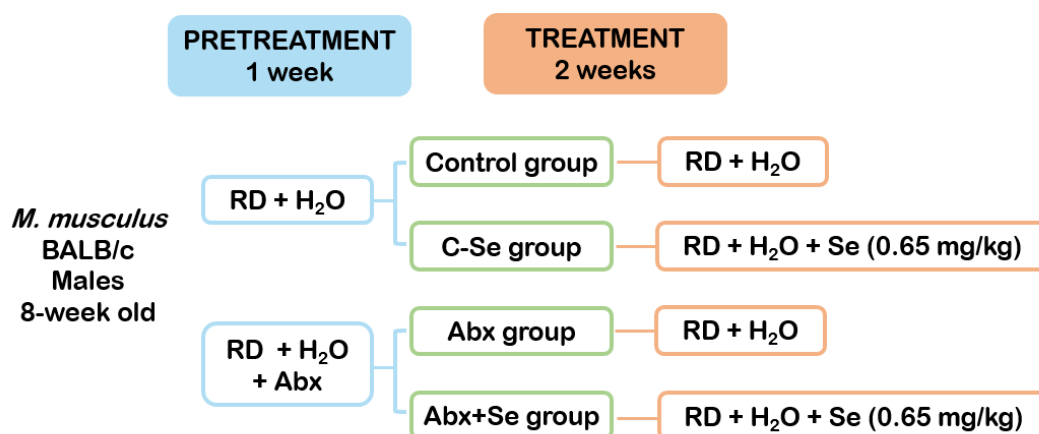


Figure S1. Experimental design. Abbreviations: RD: regular diet, Abx: antibiotics (ampicillin 1%, metronidazole 1%, neomycin 1%, vancomycin 0.5%; amphotericin B 10 mg/L).

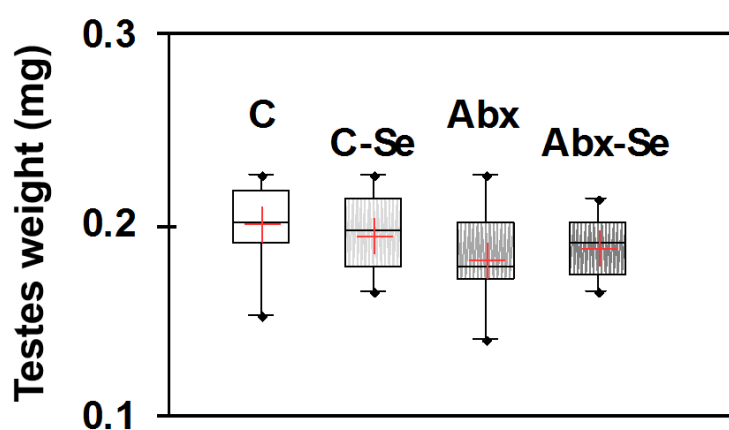
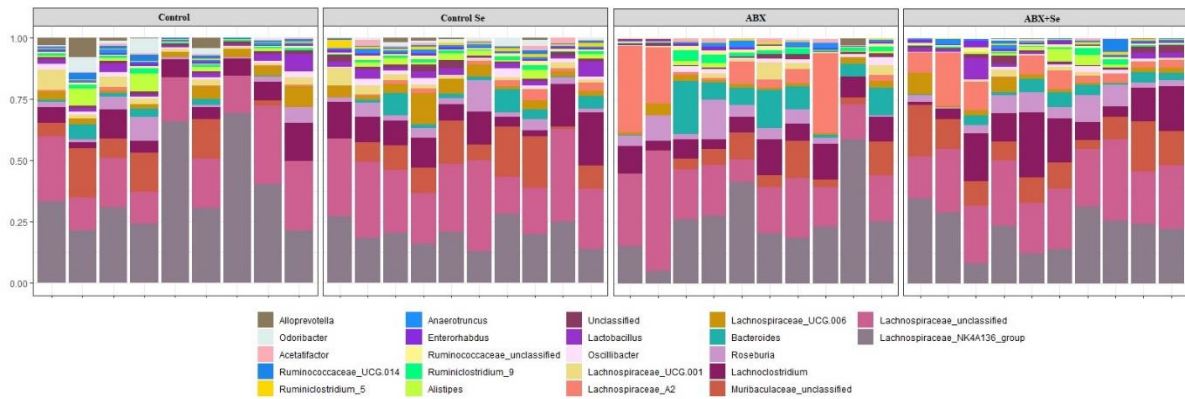


Figure S2. Box-plots showing the differences in testes weight in the four experimental groups at the end of the treatment. The red crosses correspond to the means. The line in the middle of each box represents the median for each group examined, and the edges of the box represent the first (lower limit) and the third (upper limit) quartiles. Points above or below the upper and lower limits of the whiskers can be considered outliers.

a



b

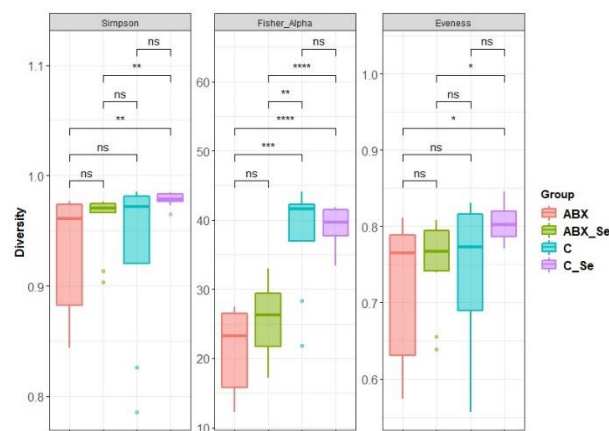


Figure S3. Description of the gut microbiota composition in the experimental groups. A) Bar plots showing the composition of gut microbiota at genus level facet by experimental group. Only those genera with a relative abundance >0.1% are shown in the figure. Unclassified groups from Lachnospiraceae, Ruminococcaceae and Muribaculaceae families were also plotted due to its importance for the general composition. **B)** Alpha diversity of the gut microbiota of the experimental groups measured as Simpson, Fisher-alpha and Evenness indexes. ABX: Antibiotic treated group, ABX_Se: Se supplementation after antibiotic treatment, C: Control group, C_Se: Se supplemented group. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

TABLES

	GPx+unr		SELENOP		SeAlb		Total Se	
Groups	Fold change	p-value	Fold change	p-value	Fold change	p-value	Fold change	p-value
CSe <i>vs</i> C	0.43	0.000	1.61	0.000	1.30	0.013	N.S	
Abx+Se <i>vs</i> C	N.S		N.S		0.65	0.017	1.24	0.001
Abx+Se <i>vs</i> CSe	2.22	0.000	0.54	0.000	0.50	0.000	1.19	0.005
Abx+Se <i>vs</i> Abx	N.S		N.S		N.S		1.15	0.010

Table S1. Significant changes in the concentration of total selenium and selenoproteins in testicles. N.S., non-significant.

	CSe <i>vs</i> C		Abx+Se <i>vs</i> C		Abx+Se <i>vs</i> CSe		Abx+Se <i>vs</i> Abx	
Element	Fold change	p-value	Fold change	p-value	Fold change	p-value	Fold change	p-value
Al	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.67	0.012	0.69	0.031
V	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Cr	2.48	0.004	0.31	0.023	0.12	0.001	N.S.	N.S.
Mn	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Fe	0.80	0.000	N.S.	N.S.	1.26	0.000	1.14	0.002
Co	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	1.56	0.028	N.S.	N.S.
Cu	0.84	0.003	0.87	0.013	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Zn	0.96	0.020	1.09	0.013	1.13	0.004	1.11	0.005
As	2.61	0.008	0.16	0.009	0.06	0.003	N.S.	N.S.
Mo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	1.28	0.024	0.53	0.003

Table S2. Elements statistically different for each comparison. N.S.: non-significant.

CONTROL			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
<i>Deferribacteres</i>	Total Se	0.67	0.048
<i>Actinobacteria</i>	SeAlb	0.764	0.017
<i>Eggerthellaceae</i>	SeAlb	0.7625	0.017
<i>Deferribacteraceae</i>	Total Se	0.67	0.048
<i>Christensenellaceae</i>	SELENOP	0.6986	0.036
<i>Ruminococcus_1</i>	SELENOP	-0.8016	0.009
<i>Ruminococcaceae_UCG005</i>	Total Se	0.882	0.002
<i>Ruminiclostridium_6</i>	SELENOP	0.7161	0.03
	Total Se	0.912	0.001
<i>Roseburia</i>	Total Se	0.71	0.032
<i>Mucispirillum</i>	Total Se	0.67	0.048
<i>Lachnospiraceae_UCG004</i>	SELENOP	0.7013	0.035
<i>Lachnospiraceae_UCG001</i>	GPx+unr	0.6979	0.037
<i>Harryflintia</i>	SeAlb	0.715	0.03
	SELENOP	0.7015	0.035
<i>Erysipelatoclostridium</i>	Total Se	0.8711	0.002
<i>Enterorhabdus</i>	SeAlb	0.6964	0.037
<i>Butyricicoccus</i>	Total Se	0.7298	0.026

Table S3. Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in control group.

CONTROL Se			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
Tenericutes	GPx+unr	0.6758	0.032
Deferribacteres	GPx+unr	-0.682	0.03
	SeAlb	0.8901	0.01
<i>Unclassified</i>	SELENOP	0.7458	0.013
<i>Streptococcaceae</i>	SELENOP	0.7268	0.017
	Total Se	-0.736	0.015
<i>Prevotellaceae</i>	GPx+unr	0.6775	0.031
	Total Se	0.6408	0.046
<i>Family_XIII</i>	SeAlb	-0.7484	0.013
<i>Enterobacteriaceae</i>	SELENOP	0.7457	0.013
	Total Se	-0.7255	0.018
<i>Deferribacteraceae</i>	GPx+unr	-0.6822	0.03
	SeAlb	0.8902	0.001
<i>Clostridiaceae_1</i>	GPx+unr	-0.8345	0.003
	SELENOP	0.7002	0.024
<i>Christensenellaceae</i>	SELENOP	-0.933	0.000
<i>Caulobacteraceae</i>	Total Se	-0.6999	0.024
<i>Anaeroplasmataceae</i>	GPx+unr	0.6761	0.032
<i>Subdoligranulum</i>	SELENOP	0.6453	0.044
	Total Se	-0.717	0.02
<i>Ruminococcaceae_UCG009</i>	SeAlb	0.6345	0.049
<i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	SELENOP	-0.6335	0.045
<i>Ruminiclostridium_5</i>	Total Se	-0.8294	0.003
<i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>	SELENOP	-0.6884	0.028
<i>Oscillibacter</i>	SeAlb	0.6484	0.043
<i>Muribaculum</i>	SELENOP	-0.7285	0.017
<i>Mucispirillum</i>	GPx+unr	-0.6825	0.03
	SeAlb	0.8902	0.001

Table S4. Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in CSe group.

CONTROL Se			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
<i>Family_XIII_UCG001</i>	SeAlb	-0.6649	0.036
<i>Faecalibacterium</i>	GPx+unr	-0.6697	0.034
	SELENOP	0.8219	0.004
	Total Se	-0.7994	0.006
<i>EscherichiaShigella</i>	SELENOP	0.7642	0.01
	Total Se	-0.7314	0.016
<i>Caulobacter</i>	SELENOP	0.7196	0.019
	Total Se	-0.7795	0.008
<i>Candidatus_Stoquefichus</i>	SeAlb	-0.6993	0.021
<i>Anaerotruncus</i>	SeAlb	0.6475	0.043
<i>Anaeroplasma</i>	GPx+unr	0.6761	0.032
<i>Alloprevotella</i>	GPx+unr	0.7556	0.011
	Total Se	0.708	0.022

Table S4 (continued). Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in CSe group.

ABX			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
Verrucomicrobia	SeAlb	0.6689	0.034
Firmicutes	SeAlb	0.7239	0.018
Bacteroidetes	SeAlb	-0.7207	0.019
<i>Unclassified</i>	SeAlb	0.7091	0.022
<i>Tannerellaceae</i>	SeAlb	-0.6536	0.04
	Total Se	0.8127	0.004
<i>Staphylococcaceae</i>	GPx+unr	0.7821	0.008
<i>Ruminococcaceae</i>	SeAlb	-0.7545	0.012
	Total Se	0.7167	0.02
<i>Lachnospiraceae</i>	SeAlb	0.7274	0.018
	Total Se	-0.6394	0.047
<i>Enterobacteriaceae</i>	SeAlb	0.7175	0.019
<i>Desulfovibrionaceae</i>	SeAlb	-0.7357	0.015
	Total Se	0.7123	0.021
<i>Clostridiaceae_1</i>	SeAlb	0.6947	0.026
<i>Caulobacteraceae</i>	SeAlb	0.7164	0.02
	Total Se	-0.6591	0.038
<i>Burkholderiaceae</i>	SeAlb	0.7747	0.009
	Total Se	-0.6467	0.043
<i>Akkermansiaceae</i>	SeAlb	0.6689	0.034
<i>Unclassified</i>	SeAlb	0.6504	0.042
<i>Subdoligranulum</i>	SeAlb	0.7536	0.012
<i>Staphylococcus</i>	GPx+unr	0.7821	0.008
<i>Ruminiclostridium_9</i>	SeAlb	-0.7192	0.019
	Total Se	0.7641	0.01
<i>Ruminiclostridium_6</i>	GPx+unr	0.7081	0.022
	SELENOP	0.6474	0.043
<i>Parvibacter</i>	SeAlb	0.7476	0.013
	Total Se	-0.6931	0.026
<i>Parabacteroides</i>	SeAlb	-0.6536	0.04
	Total Se	0.8127	0.004

Table S5. Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in Abx group.

ABX			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
<i>Muribaculum</i>	Total Se	0.6968	0.025
<i>Marvinbryantia</i>	SeAlb	0.6538	0.04
<i>Intestinimonas</i>	Total Se	0.6882	0.028
<i>Lachnospiraceae_GCA900066575</i>	GPx+unr	0.6603	0.038
	SELENOP	0.6967	0.025
<i>Flavonifractor</i>	Total Se	0.8197	0.004
<i>Family_XIII_UCG001</i>	SeAlb	-0.6821	0.03
	Total Se	0.7272	0.017
<i>Faecalibacterium</i>	SeAlb	0.7024	0.024
<i>EscherichiaShigella</i>	SeAlb	0.7466	0.013
<i>Caulobacter</i>	SeAlb	0.7164	0.02
	Total Se	-0.6591	0.038
<i>Butyrivicoccus</i>	SeAlb	-0.7341	0.016
<i>Bilophila</i>	SeAlb	-0.7332	0.016
	Total Se	0.71	0.021
<i>Lachnospiraceae_ASF356</i>	GPx+unr	0.7821	0.008
<i>Alistipes</i>	Total Se	0.708	0.022
<i>Akkermansia</i>	SeAlb	0.6689	0.034

Table S5 (continued). Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in Abx group.

ABX+Se			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
<i>Proteobacteria</i>	SELENOP	0.6479	0.043
<i>Unclassified</i>	GPx+unr	0.7233	0.018
	SELENOP	0.8523	0.002
	SeAlb	-0.8345	0.003
<i>Tannerellaceae</i>	Total Se	0.6573	0.039
<i>Peptococcaceae</i>	Total Se	0.6515	0.041
<i>Moraxellaceae</i>	GPx+unr	-0.8017	0.005
	SELENOP	-0.7519	0.012
	SeAlb	0.805	0.005
<i>Family_XIII</i>	Total Se	0.7569	0.011
<i>Eubacteriaceae</i>	Total Se	0.7286	0.017
<i>Enterobacteriaceae</i>	GPx+unr	0.7653	0.01
	SELENOP	0.7875	0.007
	SeAlb	-0.7414	0.014
<i>Desulfovibrionaceae</i>	Total Se	0.6536	0.04
<i>Clostridiaceae_1</i>	GPx+unr	0.7045	0.023
	SELENOP	0.6639	0.036
<i>Subdoligranulum</i>	GPx+unr	0.6652	0.036
	SELENOP	0.6909	0.027
<i>Ruminococcus_1</i>	Total Se	0.7149	0.02
<i>Ruminococcaceae_UCG005</i>	GPx+unr	-0.7799	0.008
	SELENOP	-0.713	0.021
	SeAlb	0.7964	0.006
<i>Parvibacter</i>	GPx+unr	0.6844	0.029
	SELENOP	0.6426	0.045
<i>Parabacteroides</i>	Total Se	0.6573	0.039
<i>Marvinbryantia</i>	Total Se	0.6575	0.039
<i>Lachnospiraceae_UCG004</i>	GPx+unr	0.7732	0.009
	SELENOP	0.7214	0.019
	SeAlb	-0.7612	0.011
<i>Lachnospiraceae_UCG001</i>	Total Se	0.7702	0.009

Table S6. Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in Abx + Se group.

ABX+Se			
Bacteria	Se	Correlation	p-value
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	GPx+unr	0.7732	0.009
	SELENOP	0.7214	0.019
	SeAlb	-0.7612	0.011
<i>Lachnospiraceae_GCA900066575</i>	Total Se	0.8111	0.004
<i>Family_XIII_UCG001</i>	Total Se	0.8185	0.004
<i>EscherichiaShigella</i>	GPx+unr	0.8137	0.004
	SELENOP	0.8185	0.004
	SeAlb	-0.7882	0.007
<i>Caulobacter</i>	Total Se	0.6541	0.04
<i>Butyrivicoccus</i>	SeAlb	0.6467	0.043
<i>Bilophila</i>	Total Se	0.6536	0.04
<i>Lachnospiraceae_ASF356</i>	SeAlb	0.6616	0.037
<i>Anaerofustis</i>	Total Se	0.7286	0.017
<i>Acinetobacter</i>	GPx+unr	-0.8017	0.005
	SELENOP	-0.7519	0.012
	SeAlb	0.805	0.005
<i>Lachnospiraceae_A2</i>	Total Se	-0.7834	0.007

Table S6 (continued). Correlation between the gut microbiota and testicular selenoproteome and total Se content in Abx + Se group.

ICP-MS operational conditions	
Forward power	1550 W
Nebulizer	MicroMist
Plasma gas flow rate	15 L·min ⁻¹
Carrier gas flow rate	1.08 L·min ⁻¹
Reaction gases	40% O ₂ , H ₂
Sampling and skimmer cones	Ni
Sampling depth	10 mm
Isotopes monitored	²⁷ Al, ⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁴ Se, ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁹⁵ Mo, ¹⁰³ Rh, ¹¹¹ Cd, ¹²¹ Sb, ²⁰⁵ Tl, ²⁰⁸ Pb
Integration time	0.3 s
Chromatographic conditions	
Flow rate	1.3 mL·min ⁻¹
Mobile phase A	0.05 M ammonium acetate
Mobile phase B	1.5 M ammonium acetate
Gradient	0-12 min 0% B
	12-25 min 100% B
	25-40 min 0%B
Valve position	position 1 (0-20 min)
	position 2 (20-24 min)
	position 1 (24-40 min)

Table S7. Operational conditions for speciation of selenoproteins and total metal content.

DORM-4 fish protein certified reference material for trace metals (mean $\pm$ SD)		
Element	<i>Obtained value</i> (mg/kg)	<i>Certified value</i> (mg/kg)
Al	1266.33 $\pm$ 27.93	1280 $\pm$ 340 (*)
V	1.47 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.14
Cr	1.88 $\pm$ 0.004	1.87 $\pm$ 0.18
Mn	2.82 $\pm$ 0.08	3.17 $\pm$ 0.26
Fe	340.87 $\pm$ 2.99	343 $\pm$ 20
Co	0.27 $\pm$ 0.03	0.25 (**)
Cu	15.86 $\pm$ 0.41	15.7 $\pm$ 0.46
Zn	48.29 $\pm$ 0.49	51.6 $\pm$ 2.8
As	6.95 $\pm$ 0.07	6.87 $\pm$ 0.44
Se	3.71 $\pm$ 0.02	3.45 $\pm$ 0.4
Mo	0.32 $\pm$ 0.02	0.25 (**)
Cd	0.31 $\pm$ 0.02	0.299 $\pm$ 0.018
Tl	0.0001 $\pm$ 0.00004	-
Sb	0.012 $\pm$ 0.001	-
Pb	0.34 $\pm$ 0.001	0.404 $\pm$ 0.062

Table S8. Total metal content of CRM DORM-4 and its established certified, reference (*), and information values (**).

Capítulo III

Chapter III

- **Metodologías ómicas para evaluar la interacción metal(-loide)-huésped-microbiota: una revisión**

“Omic methodologies for assessing metal(-loid)s-host-microbiota interplay: A review”

Ramírez-Acosta, S., Arias-Borrego, A., Navarro-Roldán, F., Selma-Royo, M., Calatayud, M., Collado, M. C., Huertas-Abril, P. V., Abril, N., & Barrera, T. G. *Analytica chimica acta* (2021), 1176, 338620. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338620>

- **El papel del selenio en la modulación del metaboloma y selenoproteoma cerebral de ratón a través del eje microbiota intestinal-cerebro mediante la combinación de perfiles metalómicos, metabolómicos, transcriptómicos y de microbiota**

“The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metallomics, metabolomics, transcriptomics and microbiota profiling”

S. Ramírez-Acosta, Paula V. Huertas-Abril, M. Selma-Royo, M. José Prieto-Álamo, M.C. Collado, N. Abril, T. García-Barrera. *Journal of Advanced Research, Submitted*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los artículos que forman parte del Capítulo III del apartado “Resultados y Discusión”, debido a restricciones relativas a derechos de autor, han sido retirados de la tesis. En sustitución de los artículos ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista y resumen.

- Ramírez-Acosta, S., Arias-Borrego, A., Navarro-Roldán, F., Selma-Royo, M., Calatayud, M., Collado, M. C., Huertas-Abril, P. V., Abril, N., & Barrera, T. G. (2021). Omic methodologies for assessing metal(-loid)s-host-microbiota interplay: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1176, p. 338620). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338620>

Enlace al texto completo: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338620>

Resumen:

Omic methodologies have become key analytical tools in a wide number of research topics such as systems biology, environmental analysis, biomedicine or food analysis. They are especially useful when they are combined providing a new perspective and a holistic view of the analytical problem. Methodologies for microbiota analysis have been mostly focused on genome sequencing. However, information provided by these metagenomic studies is limited to the identification of the presence of genes, taxa and their inferred functionality. To achieve a deeper knowledge of microbial functionality in health and disease, especially in dysbiosis conditions related to metal and metalloid exposure, the introduction of additional *meta*-omic approaches including metabolomics, metallomics, metatranscriptomics and metaproteomics results essential. The possible impact of metals and metalloids on the gut microbiota and their effects on gut-brain axis (GBA) only begin to be figured out. To this end new analytical workflows combining powerful tools are claimed such as high resolution mass spectrometry and heteroatom-tagged proteomics for the absolute quantification of metal-containing biomolecules using the metal as a “tag” in a sensitive and selective detector (*e.g.* ICP-MS). This review focus on current analytical methodologies related with the analytical techniques and procedures available for metallomics and microbiota analysis with a special attention on their advantages and drawbacks.

- Ramírez-Acosta, S., Huertas-Abril, P.V., Selma-Royo, M., Prieto-Álamo, J., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T. The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metallomics, metabolomics, transcriptomics and microbiota profiling. *Journal of Advanced Research*, Submitted.

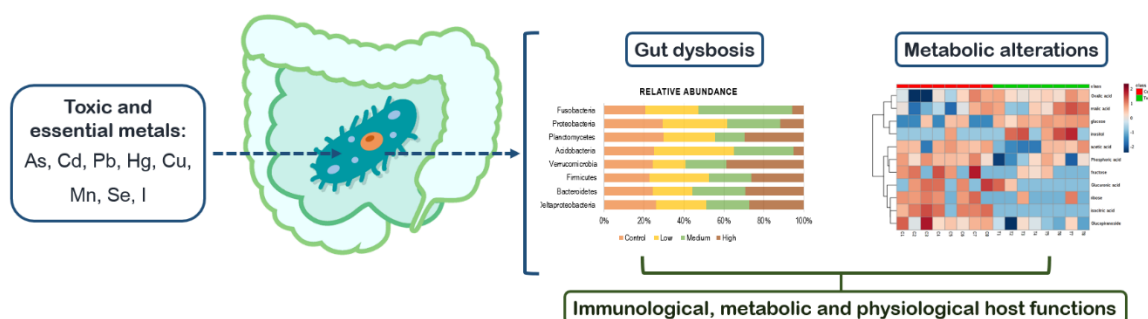
Resumen:

In the appropriate concentration and chemical form, selenium (Se) is a mineral that is very relevant to health. Recently, the impact of Se supplementation on gut microbiota has been pointed out as well as its influence on the expression of certain selenoproteins, plasma selenoproteome and gut metabolites. However, the link between Se supplementation, brain selenoproteins and brain metabolome as well as the possible connection with the gut-brain axis remains uncovered. To this end, an *in vivo* study with 40 BALB/c mice was carried out. The study included conventional (n=20) and a mice model with microbiota depleted by antibiotics (n=20) under a regular or Se supplemented diet. Brain selenoproteome was determined by transcriptomics, while brain metabolome and gut microbiota profiles were accomplished by untargeted metabolomics and metataxonomics, respectively. The total content of selenium in brain was determined to evaluate the potential influence of Se supplementation and gut microbiota on brain trace metal content. The selenoproteins genes Dio and Gpx isoenzymes, SelenoH, SelenoI, SelenoT, SelenoV and SelenoW and 31 metabolites were significantly altered in the brain after Se supplementation in conventional mice, while 11 selenoproteins and 26 metabolites were altered in microbiota depleted mice. The main altered brain metabolites were related to glyoxylate and dicarboxylate metabolism, amino acid metabolism, and also to gut microbes that have been previously related with the gut-brain axis (e.g., members of Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families). Moreover, specific associations were determined between brain selenoproteome and metabolome, which correlated with the same bacteria, suggesting an intertwined mechanism. Our results demonstrated the effect of Se on brain metabolome through specific selenoproteins gene expression and gut microbiota.

- Metodologías ómicas para evaluar la interacción metal(-loide)-huésped-microbiota: una revisión

“Omic methodologies for assessing metal(-loid)s-host-microbiota interplay: A review”

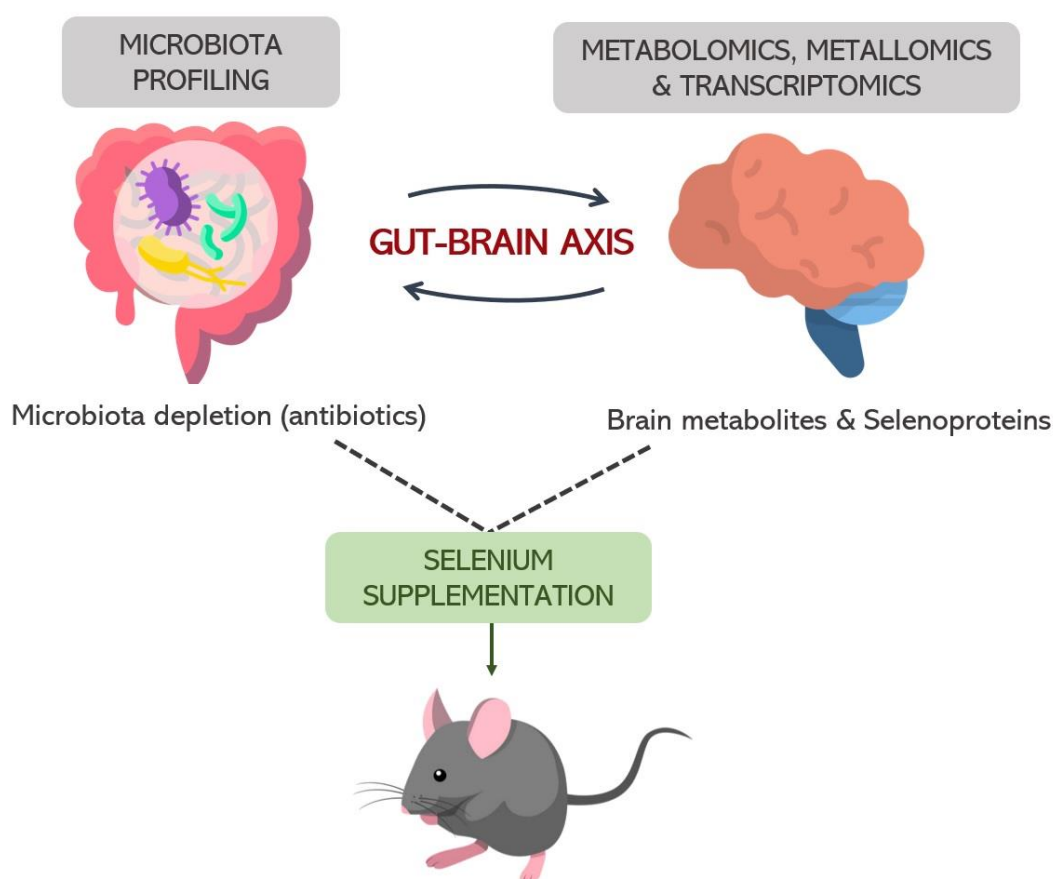
Ramírez-Acosta, S., Arias-Borrego, A., Navarro-Roldán, F., Selma-Royo, M., Calatayud, M., Collado, M. C., Huertas-Abril, P. V., Abril, N., & Barrera, T. G. *Analytica chimica acta* (2021), 1176, 338620. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338620>



- El papel del selenio en la modulación del metaboloma y selenoproteoma cerebral de ratón a través del eje microbiota intestinal-cerebro mediante la combinación de perfiles metalómicos, metabolómicos, transcriptómicos y de microbiota

“The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metallomics, metabolomics, transcriptomics and microbiota profiling”

S. Ramírez-Acosta, Paula V. Huertas-Abril, M. Selma-Royo, M. José Prieto-Álamo, M.C. Collado, N. Abril, T. García-Barrera. *Journal of Advanced Research, Submitted.*



CONCLUSIONES

CONCLUSIONS



Los resultados obtenidos de la presente Tesis Doctoral nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El modelo *in vitro* usado en esta Tesis Doctoral, la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2, ha sido empleada por primera vez para evaluar los efectos de la exposición conjunta de SeMet y CdCl₂, con el objetivo de identificar los mecanismos de acción del efecto protector de esta especie de Se frente al Cd. Los resultados de viabilidad celular han demostrado que la adición de SeMet reduce la hepatotoxicidad inducida por el Cd, y además estos resultados concuerdan los otros estudios publicados previamente en otras líneas celulares o con una experiencia de exposición similar. El contenido total de Cd en las células es menor cuando se exponen de forma conjunta con SeMet, sugiriendo que el Se puede afectar al transporte de Cd a las células.

2. Se ha optimizado una metodología de extracción para la posterior cuantificación de selenoproteínas, selenometabolitos y otras selenoespecies en células HepG2 basada en la técnica de 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS. La exposición con SeMet resulta en un incremento de todas las especies de selenio estudiadas respecto a las células control, sin embargo, la concentración de selenometabolitos y SELENOP se ve reducida ante la presencia de Cd. Esta interacción puede deberse a la formación de un complejo Cd-Se que origina a una supresión de la síntesis de selenoproteínas por parte del Cd.

3. Los estudios para evaluar la influencia de la microbiota intestinal y la suplementación de Se en ratones *Mus musculus* con microbiota deprimida con antibióticos han demostrado ser un buen modelo para estos ensayos. El uso de un cóctel de varias clases de antibióticos ha reducido de forma significativa la abundancia de géneros de bacterias pertenecientes a diferentes familias, mientras que la suplementación de Se tiene un efecto positivo y es capaz de restaurar la composición microbiana.

4. Se ha evaluado los efectos de la microbiota intestinal y la suplementación de Se en la salud reproductiva mediante la cuantificación de selenoproteínas y la homeostasis de

metales. La aproximación metalómica basada en 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS ha permitido la cuantificación de selenoproteínas en tejidos testiculares, así como la detección por primera vez de SeAlb en este tejido, detectándose cambios en el selenoproteoma testicular entre los grupos de estudio. Además, se han establecido asociaciones entre selenoproteínas y la abundancia de bacterias que están relacionadas con la actividad del esperma y hormonas sexuales. Estos resultados manifiestan la influencia de la microbiota intestinal en el selenoproteoma y su impacto en la reproducción masculina.

5. Por otro lado, se ha aplicado diferentes metodologías ómicas para evaluar el papel del Se en la modulación del metaboloma y selenoproteoma cerebral a través del eje microbiota intestinal-cerebro. El uso de las técnicas de GC-MS y UHPLC-QTOF-MS ha permitido abordar un amplio rango de metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y glicerolípidos. Se han aplicado dos metodologías diferentes basadas en la proteómica guiada por heteroelemento y de expresión génica, que han mostrado cambios en diversas selenoproteínas con funciones cerebrales. Existen correlaciones entre metabolitos cerebrales y selenoproteínas con bacterias asociadas al eje intestino-cerebro, lo que ha demostrado una vez más la influencia de la microbiota intestinal en la modulación de selenoproteínas y metabolitos y su importancia en el desarrollo neurológico.

The results obtained from this PhD Thesis allow establishing the following conclusions:

1. The *in vitro* model used in this PhD Thesis, the human hepatic carcinoma cell line HepG2, has been used for the first time to evaluate the effects of the co-exposure of SeMet and CdCl₂, with the aim of identifying the mechanisms of action of the protective effect of this selenospecies against Cd. The results of cell viability have shown that the use of SeMet reduces the hepatotoxicity induced by Cd, and these results also agree with other studies previously published in other cell lines or with a similar exposure experience. Total Cd content in cells was lower when co-exposed with SeMet, suggesting that Se may affect Cd transport into cells.

2. An extraction methodology has been optimized for the subsequent quantification of selenoproteins, selenometabolites and other selenospecies in HepG2 cells based on the 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS technique. Exposure with SeMet results in an increase of selenium species respect to control cells, however, the concentration of selenometabolites and SELENOP was reduced in the presence of Cd. This interaction may be due to the formation of a Cd-Se complex that causes a suppression of selenoprotein synthesis by Cd.

3. Studies to evaluate the influence of the intestinal microbiota and Se supplementation in *Mus musculus* mice with microbiota depleted with antibiotics have shown to be a good model for these assays. The use of a cocktail of various classes of antibiotics has significantly reduced the abundance of bacterial genera belonging to different families, while Se supplementation has a positive effect and is able to restore the microbial composition.

4. The effects of the intestinal microbiota and Se supplementation on reproductive health have been evaluated by quantifying selenoproteins and metal homeostasis. The metallomic approach based on 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS has allowed the

quantification of selenoproteins in testicular tissues, as well as the detection of SeAlb in this tissue for the first time, detecting changes in the testicular selenoproteome between the study groups. In addition, numerous associations have been established between selenoproteins and the abundance of bacteria that are related to the activity of sperm and sexual hormones. These results show the influence of the intestinal microbiota on the selenoproteome and its impact on male reproduction.

5. On the other hand, different omics methodologies have been applied to evaluate the role of Se in the modulation of the brain metabolome and selenoproteome through the intestinal microbiota-brain axis. The use of GC-MS and UHPLC-QTOF-MS techniques has covered a wide range of metabolites related to the metabolism of amino acids and glycerolipids. Two different methodologies based on heteroelement-guided proteomics and gene expression have been applied, which have shown changes in various selenoproteins with brain functions. There are correlations between brain metabolites and selenoproteins with bacteria associated with the gut-brain axis, demonstrating the influence of the gut microbiota in the modulation of selenoproteins and metabolites and their importance in neurological development.

ANEXOS

Anexo I: Índice de figuras

Figura 1. Apariencia del selenio

Figura 2. Ciclo biogeoquímico del selenio

Figura 3. Metabolismo del selenio en mamíferos. Abreviaturas: SeMet, seleniometionina; sec, selenocisteína; GRX, glutatión reductasa; TRX, tiorredoxina; TXNRD, tiorredoxina reductasa; GSH, glutatión; MGL, metionina gamma-liasa; SCLY, selenocisteína liasa; SEPHS2, selenofosfato sintetasa 2; SARS, seril-tRNA sintetasa; PSTK, fosfoseril(Sep)-tRNA cinasa; SEPSECS, Sep-tRNA:Sec-tRNA sintasa; EEFSEC, factor de elongación eucariota específico de Sec; SBP2, proteína de unión a SECIS 2.

Figura 4. Tipos de ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Figura 5. Etapas de un análisis mediante etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).

Figura 6. Ilustración del principio del análisis de dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos diferentes (a y b).

Figura 7. Especies de Se más relevantes desde un punto de vista biológico.

Figura 8. Comportamiento en U entre el estatus de Se y el riesgo de enfermedades.

Figura 9. Clasificación de los niveles de expresión mRNA de las 25 selenoproteínas en cerebro humano. FPKM: fragmentos por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas mapeadas. Datos obtenidos de la literatura (Fagerberg et al. 2014).

Figura 10. Cascada de las ómicas.

Figura 11. Workflow general para estudios metabolómicos.

Figura 12. Esquema de las características principales de un espectrómetro de masas.

Figura 13. Esquema general de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas típico.

Figura 14. Aplicabilidad de las fuentes de ionización en función de la polaridad y el tamaño del analito.

Figura 15. Esquema del proceso de ionización por electrospray (ESI).

Figura 16. Componentes básicos de un instrumento de espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

Figura 17. Eje intestino-cerebro.

Figura 18. (A) Incubadora de CO₂ con camisa de agua Forma™ Series II (Thermo Scientific). (B) una cabina de flujo laminar vertical FLOW-LAN (Indelab).

Figura 19. Sistema de digestión de microondas MARS 6 (CEM Corporation).

Figura 20. Agilent 8800 Triple Quad equipado con un sistema de cromatografía líquida 1260 Infinity LC (Agilent Technologies).

Figura 21. (A) Trace GC Ultra ITQ 900 (Thermo Scientific). (B) 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies).

Figura 22. Fotomicrografía de células control HepG2 tomadas con un microscopio Motic AE2000 (10X).

Figura 23. Visión microscópica de la cámara de Neubauer donde se pueden observar los 4 cuadrantes para el conteo celular (izquierda) y detalle de células HepG2 teñidas con azul tripán (derecha).

Figura 24. Aparición del formazan en células HepG2 expuestas a 30 µM Cd empleando la metodología descrita. Las muestras control con mayor viabilidad se encuentra en el pocillo de la zona superior izquierda.

Figura 25. Diagrama esquemático del análisis para la especiación de selenoproteínas en muestras de células HepG2 basado en 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS.

Figura 26. Diseño experimental animal para el estudio de la suplementación de Se y la influencia de la microbiota. Abx: antibióticos

Anexo II: Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del selenio.

Tabla 2. Contenido de selenio en alimentos seleccionados.

Tabla 3. Familias de selenoproteínas en mamíferos.

Tabla 4. Expresión, localización, función y desórdenes asociados de las 25 selenoproteínas en humanos. ER: retículo endoplasmático

Tabla 5. Punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (Da) de las selenoproteínas en humanos.

Tabla 6. Comparación de las técnicas para la cuantificación de selenoproteínas

Tabla 7. Comparación de las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS)

Tabla 8. Clasificación de los tipos de cromatografía líquida

Tabla 9. Analizadores más frecuentes en espectrometría de masas

Tabla 10. Comparación de técnicas atómicas. FAAS: absorción atómica de llama; GF-AAS: absorción atómica-horno de grafito; ICP-OES: espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo; ICP-MS: espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo

Tabla 11. Influencia del selenio en la microbiota intestinal de mamíferos modelo.

Tabla 12. Técnicas para el análisis de la microbiota

Tabla 13. Parámetros usados para la digestión ácida asistida por microondas de las muestras de células

Tabla 14. Condiciones instrumentales usadas para el análisis de metales en células HepG2 mediante ICP-QqQ-MS

Tabla 15. Condiciones operacionales y cromatográficas análisis para la especiación de selenoproteínas en muestras de células HepG2 basado en 2D-HPLC-SEC-AF-SUID-ICP-QqQ-MS

Tabla 16. Programa de temperatura para el análisis mediante GC-MS

Tabla 17. Parámetros de adquisición del sistema Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS

Tabla 18. Parámetros del algoritmo de extracción *Molecular Features Extraction (MFE) for small molecules*

Anexo III: Índice de abreviaturas

AEC: cromatografía de intercambio aniónico (*anionic exchange chromatography*)

AF: cromatografía de afinidad (*afinity chromatography*)

AFLP: polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

ANS: sistema nervioso autónomo (*Autonomic Nervous System*)

APCI: ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*)

APPI: fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure photo-ionization*)

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BBB: barrera hematoencefálica (*Blood-Brain Barrier*)

BLUE-HP: columnas HiTrap® Desalting blue-sepharose

CE: electroforesis capilar (*capillary electrophoresis*)

CEC: cromatografía de intercambio catiónico (*cationic exchange chromatography*)

CI: ionización química (*chemical ionization*)

CID: disociación inducida por colisión (*collision-induced dissociation*)

CNS: sistema nervioso central (*central nervous system*)

CVD: Enfermedades cardiovasculares (*cardiovascular disease*)

DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

DI: infusión directa (*direct infusion*)

DIO1, D1: Yodotironina desyodasa 1

DIO2, D2: Yodotironina desyodasa 2

DIO3, D3: Yodotironina desyodasa 3

DMDS_{Se}: dimetil diselenio

DMSe: dimetil selenio

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECACC: European Collection of Cell Cultures

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEFSEC: factor de elongación eucariota específico de Sec

EI: *impacto electrónico (electronic impact)*

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

EM: Electromultiplicador (*electron multiplier*)

ENS: sistema nervioso entérico (*Enteric Nervous System*)

EPT1: etanolamina fosfotransferasa 1 (*Ethanolamine phosphotransferase 1*)

ESI: ionización por electrospray (*electrospray ionization*)

ETA: atomización electrotérmica (*electrothermal atomization*)

FAA: absorción atómica de llama (*flame atomic absorbtion*)

FBS: suero fetal bovino (fetal bovine serum)

FC: Fold change

FISH: *Híbrida*ción específica in situ con fluorescencia (*Fluorescence in situ Hybridization*)

FTICR: ciclotrón iónico por transformada de Fourier (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*)

GABA: ácido γ -aminobutírico

GBA: eje intestino-cerebro (*Gut-Brain Axis*)

GC: cromatografía de gases (*gas chromatography*)

GC-MS: cromatografía de gases espectrometría de masas (*gas chromatography mass spectrometry*)

GF: libre de gérmenes (*Germ-free*)

GF-AAS: absorción atómica-horno de grafito (*graphite furnace atomic absorbtion spectrometry*)

GPX: Glutación peroxidasa

GPX1: Glutación peroxidasa 1

GPX2: Glutación peroxidasa 2

GPX3: Glutación peroxidasa 3

GPX4: Glutación peroxidasa 4

GPX6: Glutación peroxidasa 6

GRX: glutación reductasa

GSH: glutación

HEP-HP: columnas HiTrap® Desalting heparine-sepharose

HITChip: chip del tracto intestinal humano (*Human Intestinal Tract Chip*)

HPA: hipotalámico-pituitario suprarrenal (*Hypothalamic Pituitary Adrenal*)

ICP-MS: espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (*inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ICP-OES: espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo (*inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*)

IEF: isoelectroenfoque (*isoelectro focusing*)

IT: trampa de iones (*ion trap*)

iTRAQ: etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (*Isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantification*)

JNK: Kinasa *c-jun N-terminal* (*c-jun N-terminal kinase*)

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LA-ICP-MS: ablación láser-ICP-MS (*Laser Ablation-ICP-MS*)

LC: cromatografía líquida (*liquid chromatography*)

LC-ICP-MS: cromatografía líquida- espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (*liquid chromatography- inductively coupled plasma mass spectrometry*)

LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas (*liquid chromatography mass spectrometry*)

MeSeH: metil selenol

MFE: molecular features extraction

MGL: metionina gamma-liasa

MS: espectrometría de masas (*mass spectrometry*)

MSTFA: N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

MTBE: metil *tert*-butil éter

MTT: 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NEAA: aminoácidos no esenciales (*non-essential amino acids*)

NGS: secuenciación de próxima generación (*Next-Generation Sequencing*)

NMR: resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*)

NP: fase normal (*normal phase*)

PBS: buffer fosfato salino (*phosphate-buffer saline*)

PCA: análisis de componentes principales (*principal component analysis*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

pI: punto isoeléctrico

PLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (*partial least squares-discriminat analysis*)

PM: fotomultiplicador (*photomultiplier*)

ppm: partes por millón

ppt: partes por trillón

PSTK: fosfoseril(Sep)-tRNA quinasa

PVDF: fluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride*)

Q: cuadrupolo (*quadrupole*)

QC: control de calidad (*quality control*)

QqQ: triple cuadrupolo

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (*quantitative real time- polymerase chain reaction*)

RDA: cantidad diaria recomendada (*Recommended Dietary Allowances*)

RE: retículo endoplasmático

RFLP: polimorfismo de longitud de fragmento (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas del oxígeno (*reactive oxigen species*)

RP: fase reversa (*reverse phase*)

SARS: seril-tRNA sintetasa

SBP2: proteína de unión a SECIS 2

SCFA: ácidos grasos de cadena corta (*Short-Chain Fatty Acids*)

SCLY: selenocisteína liasa

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

SeAlb: selenoalbúmina

SEC: cromatografía de exclusión de tamaño (*size exclusion chromatography*)

Sec: selenocisteína

SECIS: secuencia de inserción de selenocisteína

SELENOF, Sel15, Sep15: Selenoproteína F, Selenoproteína 15

SELENOH, SelH: Selenoproteína H

SELENOI, SelI: Selenoproteína I

SELENOK, SelK: Selenoproteína K

SELENOM, SelM: Selenoproteína M

SELENON, SelN: Selenoproteína N

SELENOO, SelO: Selenoproteína O

SELENOP, SelP, SEPP1, SEPP, SeP: Selenoproteína P

SELENOR, SelR, SelX, SEPX1: Selenoproteína R

SELENOS, SelS, SEPS1, VIMP: Selenoproteína S

SELENOT, SelT: Selenoproteína T

SELENOV, SelV: Selenoproteína V

SELENOW, SelW: Selenoproteína W

SeMet: selenometionina

SEPHS2, SPS2: Selenofosfato sintetasa 2

SEPHS2: selenofosfato sintetasa 2

SEPSECS: Sep-tRNA:Sec-tRNA sintasa

SSID: dilución isotópica de especies específicas (*Species-Specific Isotope Dilution*)

SUID: dilución isotópica de especies inespecíficas (*species unspecific isotopic dilution*)

SUID: dilución isotópica de especies no específicas (*Species-Unspecific Isotope Dilution*)

TGGE: electroforesis en gel de gradiente de temperatura (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)

TOF: tiempo de vuelo (*time-of-flight*)

TXN: Tioredoxina

TXNRD: tioredoxina reductasa

TXNRD1, TR1, TRXR1: Tioredoxina reductasa 1

TXNRD2, TR2, TRXR2: Tioredoxina reductasa 2

TXNRD3, TR3, TRXR3: Tioredoxina reductasa 3

UHPLC: cromatografía líquida de ultra alta eficacia (*ultra high performance liquid chromatography*)

USEPA: Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*)

VIP: influencia de la variable sobre la proyección (*Variable Influence on the Projection*)

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)