



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL FI DE GRAU

EFFECTE DE LA SELENO-METIONINA SOBRE LA SENESCÈNCIA I LA FUNCIO MITOCONDRIAL EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

Pau García Ramón

Grau de Biologia

Facultat de Facultat de Ciències

Any Acadèmic 2021-22

EFFECTE DE LA SELENO-METIONINA SOBRE LA SENESCÈNCIA I LA FUNCIO MITOCONDRIAL EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

Pau García Ramón

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2021-22

Paraules clau del treball:

Se-Met, L6E9, múscul esquelètic, ROS, senescència, funció mitocondrial

Nom Tutor/Tutora del Treball Margalida Torrens Mas

Nom Tutor/Tutora (si escau)

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resum

La sarcopènia és una malaltia relacionada amb la pèrdua de la massa muscular i la seva funció amb relació a l'envelliment. Aquest estudi intenta determinar si la Seleno-Metionina (Se-Met), un aminoàcid amb capacitats antioxidants, és capaç de millorar la situació d'aquesta patologia des dels punts de vista de la senescència cel·lular, la funció mitocondrial i la producció d'enzims antioxidants, aplicada a la línia cel·lular L6E9. L'experiment fou dividit en tres tractaments: el control, el tractament amb Se-Met sense capacitat antioxidant (10 µM) i el tractament amb propietats antioxidants (100 µM). Es realitzaren una sèrie de proves per a determinar la viabilitat cel·lular i els nivells de radicals lliures, així com l'expressió de gens implicats en la capacitat antioxidant, la funció mitocondrial i la senescència. Es va determinar que el tractament amb 100 µM de Se-Met sí té un efecte antioxidant sobre cèl·lules musculars esquelètiques, a més de mostrar diferències en l'expressió de gens com *Ppargc1a*, *Tp53* i *Sirt3*, entre d'altres. L'expressió de *Tp53* ha estat la més destacada de tot l'experiment, sent un punt clau per a futurs estudis sobre aquest seleno-compost. Tot i que farien falta més estudis per a determinar els efectes d'aquest aminoàcid sobre la sarcopènia, s'intueix que podria tenir un bon futur per a combatre aquest tipus de malalties.

Resumen

La sarcopenia es una enfermedad relacionada con la pérdida de la masa muscular y su función con relación al envejecimiento. Este estudio intenta determinar si la Seleno-Metionina (Se-Met), un aminoácido con capacidades antioxidantes, es capaz de mejorar la situación de esta patología desde los puntos de vista de la senescencia celular, la función mitocondrial y la producción de enzimas antioxidantes, aplicada a la línea celular L6E9. El experimento fue dividido en tres tratamientos: el control, el tratamiento con Se-Met sin capacidad antioxidante (10 µM) y el tratamiento con propiedades antioxidantes (100 µM). Se realizaron una serie de pruebas para determinar la viabilidad celular y los niveles de radicales libres, así como la expresión de genes implicados en la capacidad antioxidante, la función mitocondrial y la senescencia. Se determinó que el tratamiento con 100 µM de Se-Met sí tiene un efecto antioxidante sobre células musculares esqueléticas, además de mostrar diferencias en la expresión de genes como *Ppargc1a*, *Tp53* y *Sirt3*, entre otros. La expresión de *Tp53* ha sido la más destacada de todo el experimento, siendo un punto clave para futuros estudios sobre este seleno-compuesto. A pesar de que harían falta más estudios para determinar los efectos de este aminoácido sobre la sarcopenia, se intuye que podría tener un buen futuro para combatir este tipo de enfermedades.

Abstract

Sarcopenia is a disease characterized by to the loss of muscle mass and function with aging. This study attempts to determine whether Seleno-Methionine (Se-Met), an amino acid with antioxidant properties, is able to improve the situation of this pathology at the level of cellular senescence, mitochondrial function, and the production of antioxidant enzymes, applied to the L6E9 cell line. The experiment was divided into three treatments: control, treatment with Se-Met with no antioxidant capability (10 µM) and treatment with antioxidant properties (100 µM). Several experiments were carried out to determine the cellular viability and levels of free radicals, as well as the expression of genes involved in antioxidant defense, mitochondrial function, and senescence. The treatment with 100 µM of Se-Met has an antioxidant effect on skeletal muscle, and affects the gene expression of *Ppargc1a*, *Tp53* and *Sirt3* genes, among others. *Tp53* expression has been the most prominent of the entire experiment, being a key point for future studies of this seleno-compound. Although further studies are needed to determine the effects of this amino acid on sarcopenia, it shows promise against this type of disease.

Índex

Resum	1
Resumen.....	1
Abstract	1
Introducció	3
Sarcopènia.....	3
Paper de les espècies reactives d'oxigen (ROS) en la sarcopènia	4
Efecte de la senescència sobre la sarcopènia	5
Efecte sobre la funció mitocondrial.....	6
Seleno-Metionina (Se-Met)	6
Biosíntesi.....	7
Reemplaçament de Metionina per Seleno-Metionina.....	7
Ingesta, acumulació i excreció.	8
Ús en la síntesi de la Glutatió Peroxidasa (GSH-Px).	8
Objectius	8
Material i mètodes	9
Materials i reactius.....	9
Cultiu cel·lular i tractaments.....	9
Assaig de viabilitat cel·lular.....	9
Mesura de la producció de ROS	10
RT-qPCR.....	10
Anàlisi estadístic	12
Resultats	12
Elevades concentracions de Se-Met afecten la supervivència cel·lular de fibroblasts en cultiu.....	12
Nivells de ROS.....	13
L'expressió de la sirtuïna 3 pareix tenir una variació en resposta a Se-Met	14
L'expressió de gens relacionats amb la funció mitocondrial es veu modulada en resposta a Se-Met	15
L'expressió de certs gens implicats en la senescència es veuen modulats en resposta a Se-Met	16
Discussió.....	17
Conclusions	19
Agraïments	19
Bibliografia	19

Introducció

Sarcopènia

La sarcopènia (del grec *σαρκός*–*sarkós*, que significa “carn”–i *πενία*–*penia*, que significa “deficiència”–) és un desordre progressiu i generalitzat del múscul esquelètic relacionat amb una pèrdua accelerada de la massa muscular i la seva funció (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019). Per a diagnosticar aquesta malaltia és necessari mesurar la massa, la força muscular i el rendiment físic, segons Cruz-Jentoft & Sayer (2019). Quan es mesura la força de premsió i aquesta resulta baixa, es diu que és probable patir sarcopènia. És en el segon mesurament, la massa muscular, quan es confirma la patologia si els valors són menors als referenciats per la *European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSOP). L'avanç de l'edat és un factor que modifica l'homeòstasi del múscul esquelètic, el qual necessita un equilibri entre la regeneració i la hipertròfia a través de mecanismes complexos i poc coneguts. Com pot observar-se a la **figura 1**, el mal funcionament dels mitocondris, juntament amb la inflamació, l'apoptosi, l'estrès oxidatiu o canvis en hormones i factors de creixement, entre d'altres, contribueixen en gran manera en l'avanç d'aquesta patologia.

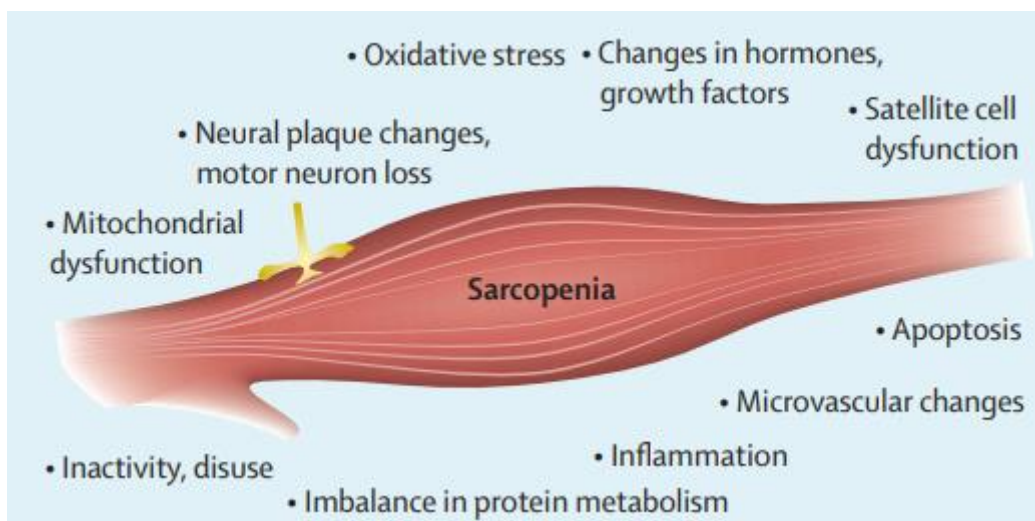


Figura 1. Origen multifactorial de la sarcopènia. Figura extreta de Cruz-Jentoft & Sayer (2019).

Els canvis cel·lulars que s'observen en teixits musculars amb sarcopènia inclouen una reducció de la grandària i del número de miofibres, afectant, en particular, a les fibres tipus II. Aquest fet es deu, en part, a una transició entre les fibres de tipus II i I amb l'edat, sumat a la mioesteatosi (infiltració de greix intramuscular i intermuscular) i un nombre reduït de cèl·lules satèl·lit que es diferencien en fibres de tipus II (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019). A més, la integritat dels mitocondris localitzats en els miòcits es veu modificada (Picca *et al.*, 2018). S'han

observat canvis moleculars que involucren alteracions en la via de senyalització de complexos com el factor de creixement insulínic 1 (IGF-1), diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer (mTOR) i les proteïnes FOX (Ziaaldini *et al.*, 2017). Segons Brown *et al.* (2015): “a causa d'aquesta patologia es produeix una desregulació de l'expressió gènica per al múscul esquelètic, probablement mitjançant a través de canvis epigenètics i modulats mitjançant microARNs”.

Paper de les espècies reactives d'oxigen (ROS) en la sarcopènia

Com s'observa en la **figura 2**, un dels principals factors que podrien afavorir l'aparició de sarcopènia és l'estrès oxidatiu, el qual pot estar estretament lligat amb un altre factor, la inflamació. Existeixen estudis enfocats en els efectes sobre l'alteració del sistema de defensa antioxidant i la reducció de la massa muscular a mesura que l'ésser humà envella (Deepa *et al.*, 2019). Aquest fet queda demostrat per Deepa *et al.*, (2019); Meng & Yu, (2010), ja que observen com la pèrdua de massa muscular està associada a un gran increment de la producció de radicals lliures en ratolins salvatges amb sarcopènia. A més, Deepa *et al.* (2019) mostren un increment del 30% de la producció de radicals lliures mitocondrials (mtROS) en ratolins salvatges amb 30 mesos d'edat. S'ha observat com les ROS solen aparèixer com a segons missatgers del factor de necrosi tumoral α (TNF- α) en el teixit muscular esquelètic, activant, de manera directa o indirecta, el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Reid & Li, 2001), el qual regula positivament citocines com la interleucina 6 (IL-6) (Chung *et al.*, 2009). Els efectes de TNF- α com a citocina pro-inflamatòria poden induir l'apoptosi cel·lular en teixit muscular.

Quan l'estrès oxidatiu indueix la inflamació del teixit muscular es produeix una alteració de l'equilibri redox intracel·lular que sembla ser un dels factors primaris que acabarien causant un estat crònic d'inflamació lleu (Meng & Yu, 2010).

Actualment, sabem que elevats nivells de radicals lliures poden produir danys directament sobre macromolècules com ara les proteïnes, els àcids nucleics... S'ha demostrat que la inflamació també perjudica el funcionament dels mitocondris en múscul cardíac (Mariapann *et al.*, 2009). Per això, l'efecte conjunt de l'estrès oxidatiu i la inflamació en el múscul esquelètic pot portar a la disfunció dels mitocondris, la reducció de la síntesi proteica, l'increment de la degradació peptídica i, en funció de les rutes de senyalització que s'activin, l'apoptosi (Meng & Yu, 2010).

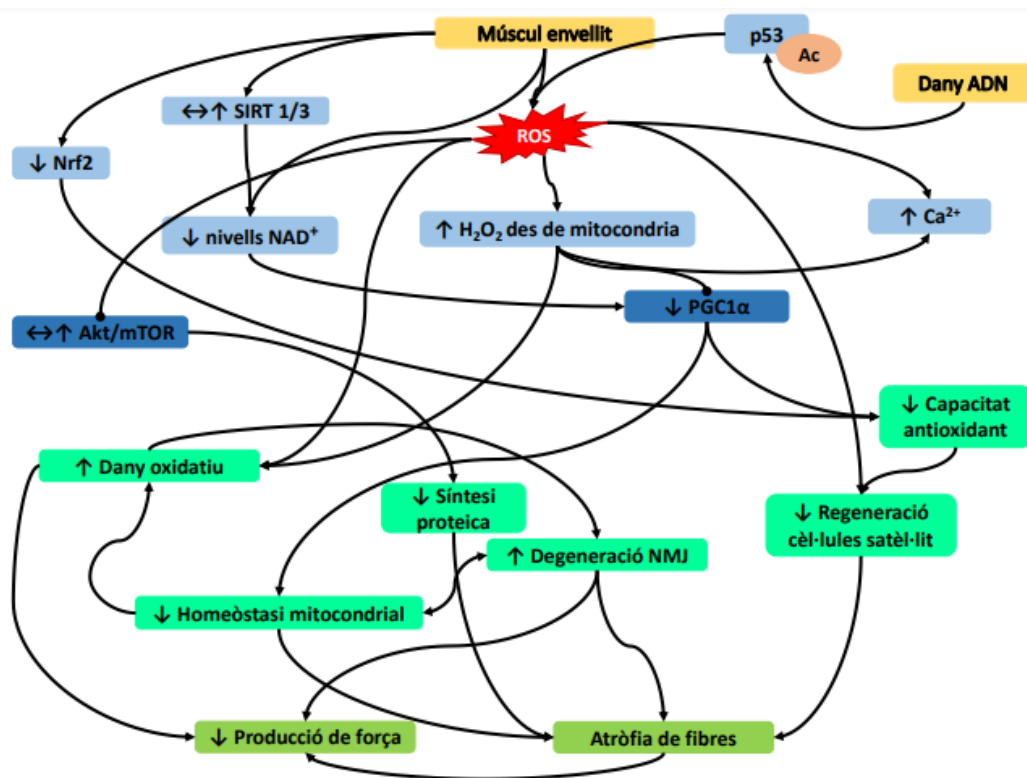


Figura 2. Vies de senyalització redox relacionades amb l'envelliment del múscul i la sarcopènia. Les línies que hi ha entre les caixes indiquen interacció. Aquelles línies que acaben en punta representen un increment o que promouen l'activitat d'una determinada molècula, mentre que aquelles que tinguin un cercle ple indiquen inhibició o repressió. Abreviacions: p53-Ac: p53 acetilada; ROS: espècies reactives d'oxigen; SIRT: sirtuïna; Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionat amb el factor 2; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleòtid; H₂O₂: peròxid d'hidrogen; Ca²⁺: ions calci; mTOR: diana de rapamicina a mamífers; PGC1α: co-activador 1-α del receptor γ activat pel proliferador de peroxisomes; NMJ: unió neuromuscular. Figura adaptada de Foreman, Hesse & Ji (2021).

Efecte de la senescència sobre la sarcopènia

La senescència cel·lular és una resposta caracteritzada per la imposició d'un arrest permanent i irreversible del cicle cel·lular. Un altre fet característic són les alteracions fenotípiques induïdes per diversos factors estressants (tals com mutacions oncogèniques, erosió dels telòmers, estrès epigenètic...) després d'un nombre finit de divisions. A més a més, està estretament relacionada com un dels contribuïdors de l'avanç de l'edat i malalties associades a aquest avanç (Childs *et al.*, 2015), tot i que també té efectes positius com podria ser l'eliminació de cèl·lules que han esdevingut innecessàries.

Aquest procés pot iniciar-se a causa de l'eix del sensor de dany mutat d'atàxia telangièctasi (ATM)-p53-p21, les xarxes supressores de tumor p16^{INK4a}-Rb i altres potencials rutes. D'entre les dues rutes acabades de mencionar, tant el p53 com el pRB són dos pèptids

supressors de tumors “guardians” que inicien els mecanismes per aturar la progressió de la senescència (He *et al.*, 2022).

Per altra banda, el factor de creixement transformant β (TGF- β) juga també un rol important en la senescència, ja que té la capacitat de modular l'expressió de gens implicats en processos d'envelliment com poden ser la proliferació cel·lular, la producció de radicals lliures, la regulació del cicle cel·lular, l'apoptosi o la resposta a les proteïnes desplegadas, entre d'altres. Aquesta proteïna pot induir l'expressió de p21 i de la sirtuina 6 (SIRT6), una histona deacetilassa de classe III que contraresta la senescència (Tominaga & Suzuki, 2019).

A més, cal destacar el paper de mTOR. Quan s'activa el complex 1 de mTOR es pot produir la senyalització i activa la hipertrofia muscular (Baek *et al.*, 2021). L'activitat de mTORC1 es troba regulada per la disponibilitat de nutrients, constituint així el principal mediador de la senyalització de nutrients, sent important per a la regulació del creixement.

Efecte sobre la funció mitocondrial

El coactivador del receptor gamma activat pel proliferador de peroxisomes (PGC-1 α) té una importància vital en múscul amb relació a la capacitat d'estimular la biogènesi mitocondrial. Quan es troba inactivitat muscular crònica, aquesta sol anar acompanyada d'una expressió significativament reduïda de PGC1- α , que també coincideix amb una reducció de les funcions mitocondrials i una major susceptibilitat a l'apoptosi iniciada pel mitocondri. (Adhihetty *et al.*, 2009).

Altres molècules importants per a la funció mitocondrial són el factor de respiració nuclear 1 (NRF1) i el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM), les quals activen gens clau necessaris per a la transcripció i replicació de l'ADN mitocondrial. També cal ressaltar el paper de gens com el que codifica per al complex citocrom C oxidasa (COX), dels quals podem destacar-ne el COX1, COX2 i COX3 (codificades als mitocondris) com les tres subunitats que conformen el nucli catalític de l'enzim i COX4 (codificada al nucli) que es correspon amb el darrer enzim de la cadena de transport d'electrons (Timón-Gómez *et al.*, 2018). L'existència de subunitats codificades als mitocondris i al nucli evidencia la necessitat d'una regulació molt precisa perquè es doni l'expressió simultània d'aquestes i puguin formar-se els complexos, el que s'aconsegueix gràcies a PGC1- α .

Seleno-Metionina (Se-Met)

El seleni (Se) és un micronutrient traça essencial que trobem a aliments com els cereals, els bolets, les cebes, peixos o carns, entre d'altres. Aquest element ha estat associat amb diverses activitats, com poden ser la capacitat citostàtica, antiinflamatòria o antioxidant. (Pons *et al.*, 2020).

La Seleno-metionina (Se-Met) és un anàleg orgànic de la metionina que ha mostrat presentar més beneficis que el seleni inorgànic quant a l'increment, l'acumulació a teixits i la millora de la capacitat antioxidant d'animals de granja (Wan *et al.*, 2020). La qual cosa fa que la Se-Met es consideri un possible suplement alternatiu de seleni per a l'alimentació animal.

Biosíntesi

Els cereals, entre altres organismes vegetals, tenen la capacitat de transformar el seleni inorgànic en seleno-metionina principalment. Solen incorporar-ho a la proteïna en lloc d'una metionina convencional, ja que el tRNA-Met no discrimina entre ambdues.

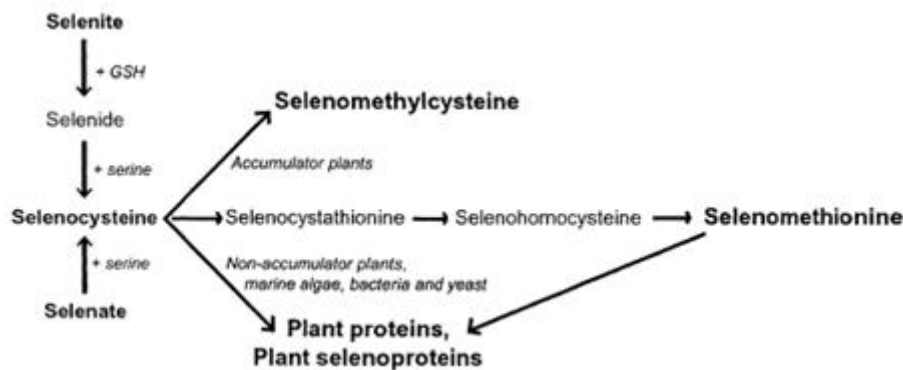


Figura 3. Ruta biosintètica de la seleno-metionina. Extret de: Schrauzer (2003).

La principal via per a la síntesi d'aquest compost tant a plantes, com algues marines i llevats queda reflectida a la **figura 3**. La producció d'aquest aminoàcid per part de les espècies vegetals variarà en la quantitat de seleni present a l'ambient per a la seva síntesi.

La síntesi de la Seleno-Metionina es produeix de forma anàloga a la de la metionina segons Schrauzer, (2000). Aquest fet fou constatat mitjançant l'ús d'una soca mutant de llevat que fou incapaç de sintetitzar ambdós compostos en presència de seleni al medi.

Reemplaçament de Metionina per Seleno-Metionina.

El fet que a una cadena proteica aparegui una Se-Met en lloc d'una Met no altera generalment la seva estructura proteica, segons evidències amb estudis cristal·logràfics realitzats amb rajos X. (Schrauzer *et al.*, 2003).

A més, segons Walter *et al.*, 1973 la Se-Met té la capacitat de revertir la seva pròpia oxidació en presència del glutatió reduït (GSH), suggerint el gran potencial que podria tenir de ser catalíticament actiu com a un antioxidant, específicament contra el peroxinitrit (Schrauzer *et al.*, 2003).

Per contra, s'ha observat que certs grups propers a aquest nou aminoàcid, per exemple, el grup metil unit al seleni de la Se-Met és molt més hidrofòbic en comparació a la resta de grups metils units al sofre de Met. (Poulsen *et al.*, 2001).

Un altre desavantatge trobat involucraria una substitució excessiva de Met per Se-Met, la qual ha resultat en una reducció de l'estabilitat proteica de forma *in vitro* (Schrauzer *et al.*, 2003), tot i que no implica que passi el mateix *in vivo*.

Ingesta, acumulació i excreció.

Un cop s'ingereix aquest aminoàcid, ja que no pot ser sintetitzat per animals superiors, és absorbit a l'intestí prim. Concretament, es produeix mitjançant el sistema de transport d'aminoàcids neutres dependent de Na⁺. La taxa de renovació a escala corporal de Se-Met és més lenta que la d'altres compostos amb seleni, indicant que s'incorpora a llarg termini. (Schrauzer, 2003).

Qualsevol Se-Met que no és metabolitzada de forma immediata és incorporada a òrgans amb taxes elevades de síntesi proteica, com poden ser el múscul esquelètic, eritròcits, ronyons, pàncrees, fetge, estómac i la mucosa gastrointestinal. (Schrauzer, 2000). El múscul esquelètic comprèn el reservori més gran tissular de Se-Met, arribant a acumular fins a un 46,9% del seleni total present al cos. (Schrauzer *et al.*, 2003).

Després d'una sola dosi oral, administrada a dones de Nova Zelanda, de Se-Met corresponent a 1 mg de seleni, entre el 5 i el 22% de la dosi fou eliminada en 24 h per orina i el 3,5% per via fecal. A més, la Se-Met s'incorpora inespecíficament a l'albumina i es transforma en part de la reserva de metionina. (Burk *et al.*, 2001). Els nivells de seleni en sang dependran completament de la ingesta i, de forma semblant, els nivells de seleni en cabells i ungles. (Chobert *et al.*, 2003).

Ús en la síntesi de la Glutatió Peroxidasa (GSH-Px).

La glutatió peroxidasa (GSH-Px) és un enzim que s'encarrega de catabolitzar la reducció del peròxid d'hidrogen a aigua, participant també en la reducció d'hidroperòxids lipídics a alcohols, emprant el glutatió reduït (GSH) com a reductor.

Aquest enzim fou el primer seleno-enzim que hom va conèixer, les avaluacions quantitatives relacionades amb la biodisponibilitat de seleni en diverses formes químiques estudiaven quasi de forma exclusiva quina era la quantitat mínima d'un compost amb seleni requerit per a la inducció de GSH-Px en sèrum, eritròcits o fetge. (Chobert *et al.*, 2003).

Objectius

Pel fet que la Se-Met ha mostrat un potencial antioxidant important, i que el múscul esquelètic n'és el principal reservori, un increment d'aquest aminoàcid podria influir en el desenvolupament de la sarcopènia. Per a analitzar els efectes de la Se-Met sobre els processos relacionats amb l'aparició d'aquesta patologia, s'han cultivat cèl·lules de múscul esquelètic de rata L6E9 i s'han tractat amb diverses concentracions de Se-Met per a :

OE.1. Analitzar l'efecte antioxidant de la Se-Met mitjançant la determinació dels nivells de ROS produïdes en múscul esquelètic de rata en presència i absència d'aquest seleno-aminoàcid.

OE.2. Establir una concentració de Se-Met que no interfereixi amb la viabilitat de les cèl·lules.

OE.3. Determinar l'expressió de gens relacionats amb la senescència, funció mitocondrial i l'efecte antioxidant a cèl·lules musculars.

Material i mètodes

Materials i reactius

Reactius específics com la SeMet foren adquirits de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). El Dulbecco's modified Eagle's medium fou comprat a *LabClinics*, el Sèrum Boví Fetal i la solució de antibiòtics (penicil·lina i estreptomycina) provenen de *Biological Industries* (Kibbutz Bei Haemek, Israel). Els reactius rutinaris foren proporcionats per *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA), *Panreac* (Barcelona, Espanya) i *Bio-Rad Laboratories* (Hèrcules, CA, EUA).

Cultiu cel·lular i tractaments

La línia cel·lular L6E9 de mioblasts de rata es va mantenir amb Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementat amb vermell fenol amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) y 1% de penicil·lina/estreptomycina a una atmosfera al 5% de CO₂ a 37°C per a mantenir la seva forma de fibroblast esquelètic.

Per a diferenciar-los a mioblasts es varen mantenir amb DMEM suplementat amb vermell fenol amb un 2% de sèrum fetal boví (FBS) i un 1% de penicil·lina/estreptomycina a una atmosfera al 5% de CO₂ a 37°C (Mikula *et al.*, 2005) durant 5 dies.

Tots els tractaments foren duts a terme quan les cèl·lules s'havien diferenciat i havien arribat al 100% de la confluència. Per a realitzar els assajos de viabilitat cel·lular i producció de ROS, les cèl·lules foren tractades amb concentracions creixents de Se-Met (des de 1 nM fins a 1 mM). Per a les anàlisis mitjançant PCR foren emprades les concentracions 10 µM y 100 µM.

Assaig de viabilitat cel·lular

Es van sembrar 10.000 cèl·lules amb DMEM per pou a una placa de 96 pous (p96). Les cèl·lules foren tractades amb la bateria de concentracions creixent de Se-Met mencionada anteriorment durant 48 h. El nombre de cèl·lules viables fou determinat per l'emissió de fluorescència de l'ADN unit al reactiu Hoechst 33342. Posteriorment, després de les 48 h de tractament, es va aspirar el DMEM de cada pou i es va rentar amb PBS. Després, varen ser afegits 100 µL de solució Hoechst 33342 5 µg/mL. La solució Hoechst fou incubada amb PBS

durant 5 min a 37°C. La fluorescència fou mesurada a 350 nm d'ona excitatòria i 455 nm d'ona d'emissió.

Mesura de la producció de ROS

Varen ser cultivades 10.000 cèl·lules per pou a una p96 amb les mateixes condicions que a l'assaig de viabilitat cel·lular. Les cèl·lules foren tractades de la mateixa forma. Els nivells de ROS després del tractament foren determinats mitjançant el reactiu de diacetat de diclorofluoresceïna (DCFDA). Passades les 48 h de tractament, el DMEM de cada pou fou aspirat i van ser afegits 100 µL de DCFDA (PBS-glucosa 20 mM i DCFDA 10 µM). La placa fou incubada durant 30 min a una atmosfera al 5% de CO₂ a 37°C. La fluorescència fou mesurada a una ona d'excitació de 570 nm i una ona d'emissió de 585 nm. Es va corregir la fluorescència de cada pou pel nombre de cèl·lules viables mesurades amb el mètode de Hoechst.

RT-qPCR

Les cèl·lules foren cultivades en plaques de 100 mm de diàmetre (p100) fins a arribar al 100% de confluència. Posteriorment, les cèl·lules foren diferenciades i, 48 h. després, es va iniciar el tractament amb les concentracions 10 µM y 100 µM durant 48 h.

L'ARN total de les cèl·lules fou aïllat emprant 1 mL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguint les instruccions del fabricant. Posteriorment, es va quantificar l'ARN total mitjançant el nanoespectrofotòmetre BioSpec (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan) programat a 260 nm i 280 n, obtenint així el rati 260/280. Les mostres foren retrotranscrites a ADNc per a la seva posterior anàlisi mitjançant q-PCR.

Es va retrotanscriure 1 µg d'ARN total a ADNc durant 10 min. a 25°C, 50 min. a 37°C, 15 min. a 70°C i, finalment, a 4°C un temps indefinit amb la següent mix: 50 µM Random Hexamers, 10 mM de dNTP mix, 20 U/mL de ARNasa OUT, 10 mM DTTs i 200 U/µL M-Mlv. L'ADNc obtingut de cada mostra fou diluït en una proporció 1/10.

Per a dur a terme la qPCR es va realitzar una MIX composta per 2,1 µL d'aigua lliure de ARNases; 0,2 µL d'encebador (directe) i 0,2 µL d'encebador (invers); i 5 µL de SYBR Green (tenint en compte que aquests volums fan referència a una única mostra). A continuació, foren afegits 7,5 µL de MIX i després 2,5 µL de mostra, respectivament, a un dels pous de la placa de lectura. Abans de realitzar la lectura amb el LightCycler480 es va donar un cop de centrífuga a la placa de lectura.

El programa d'amplificació va incloure una passa de desnaturalització a 95°C, 5 min., seguit de 45 cicles amb una passa de desnaturalització (10 s., 95°C), una passa d'alineament (10 s., temperatura dependent dels encebadors, Taula 1), i una passa d'elongació (12 s., 72°C),

Els valors Ct de la PCR a temps real es van analitzar tenint en compte l'eficiència de la reacció i referint aquests resultats a dos gens constitutius (TATA Binding Protein-*Tbp*-, *Gapdh*) utilitzant el software estàndard GenEx (Multi-SAnalises, Sweden).

Taula 1. Llistat d'encebadors emprats a la q-PCR. *Mt-Co1*: COX1; *Cox4i1*: COX4; *Gapdh*: GAPDH; *Mtor*: mTOR; *Nrf2*: NRF2; *Ppargc1a*: PGC1- α ; *Cdkn2a*: p16; *Cdkn1a*: p21; *Tp53*: p53; *Sqstm1*: p62; *Sirt3*: SIRT3; *Sirt6*: SIRT6; *Sod1*: Superòxid dismutasa 1 (SOD1); *Sod2*: superòxid dismutasa 2 (SOD2); *Tbp*: TBP; *Tfam*: TFAM

Nombre d'accés al gen	Directe	Temperatura d'alineament (°C)
	Invers	
<i>Mt-Co1</i>	GCTTTTGACTGCTTCCTCCA AATCTACGGATACCCCAGCA	60
<i>Cox4i1</i>	CAAGGGCACCAATGAGTGGA AAGCCCTGAATGGGGTTGAC	60
<i>Gapdh</i>	CTGGTGGTCCAGGGGTCTTA CCACTCCTCCACCTTTGACG	60
<i>Mtor</i>	CTGATGTCATTTATTGGCACAAA CAGGGACTCAGAACACAAATGC	60
<i>Nrf2</i>	GCAACTCCAGAAGGAACAGG AGGCATCTTGTTTGGGAATG	58
<i>Ppargc1a</i>	ATGTGCAGCCAAGACTCTGTA GGTCACTACACCACTTCAATCCA	60
<i>Cdkn2a</i>	TCCTCCGCTGGGAACGT GGCGTGCTTGAGCAGAAGTT	55
<i>Cdkn1a</i>	GAGCAGTGCCCGAGTTAAGG TGGAACAGGTCGGACATCAC	60
<i>Tp53</i>	TTCCCTCAATAAGCTGTTCTGCC TGCTCTCTTTGCACTCCCTGG	66
<i>Sqstm1</i>	CTAGGCATCGAGGTTGACATT CTTGGCTGAGTACCACTTTATC	56
<i>Sirt3</i>	AGGCCATATCCCTCTCTGT ACTCCCTGGGGATCTGAAGT	55

<i>Sirt6</i>	GACCTAACGCTCGCTGATGA CTGGCGGTCATGTTTTGTGG	60
<i>Sod1</i>	ACTTCGAGCAGAAGGCAAGC CCAGGTCTCCAACATGCCTC	60
<i>Sod2</i>	ACCGAGGAGAAGTACCACGA TAGGGCTCAGGTTTGTCCAG	60
<i>Tbp</i>	CACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC CGCAGTTGTTTCGTGGCTCTC	60
<i>Tfam</i>	GCTAAACACCCAGATGCAAAA CGAGGTCTTTTTGGTTTTCC	60

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic fou realitzant als nivells de ROS, la viabilitat cel·lular i els tractaments de Se-Met. Per tant, va ser emprat el programa informàtic R Studio per a calcular contrastos d'hipòtesi de mostres independents es va utilitzar el test t entre els diversos tractaments (sent la bateria de concentracions de Se-Met en l'assaig dels nivells de ROS i la viabilitat cel·lular; i sent els grups Control i 10 µM Se-Met; i Control i 100 µM Se-Met). Inicialment, fou comprovada la normalitat de les dades mitjançant la prova Shapiro-Wilk. Posteriorment, es va comprovar la homocedasticitat amb el test de Bartlett. Finalment, es va tenir en compte que a totes les proves estadístiques, contrast d'hipòtesi inclòs, el nivell de significació fou de 0,05.

Resultats

Elevades concentracions de Se-Met afecten la supervivència cel·lular de fibroblasts en cultiu

La supervivència dels mioblasts tractats amb altes dosis de Se-Met (1 mM) es va veure extremadament reduïda, minvant quasi per complet la seva viabilitat (**Fig. 4**). En canvi, a mesura que la dosi fou disminuint es va observar un augment de la proliferació cel·lular, sobretot a les concentracions emprades a aquest experiment. Posteriorment, veiem com la viabilitat cel·lular a la resta de concentracions decreixents es troba més o menys estable.

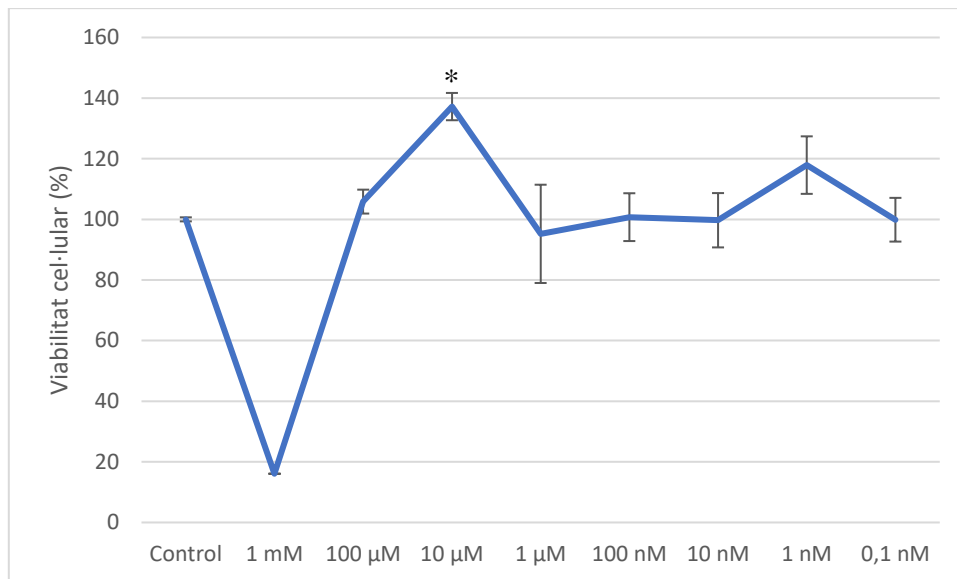


Figura 4. Assaig de viabilitat cel·lular a la línia cel·lular L6E9 emprant Se-Met. Els detalls de l'assaig es troben detallats a l'apartat de material i mètodes. $p_{100 \mu\text{M SeMet}}=0,1996$; $p_{10 \mu\text{M SeMet}}=0,000363$; $p_{1 \mu\text{M SeMet}}=0,78$; $p_{100 \text{ nM SeMet}}=0,1004$; $p_{10 \text{ nM SeMet}}=0,9751$; $p_{1 \text{ nM SeMet}}=0,1179$; $p_{0,1 \text{ nM SeMet}}=0,9871$. S'han emprat quadruplicats per a l'anàlisi de la viabilitat cel·lular. * significa que hi ha diferència estadísticament significativa ($p < 0,05$).

Nivells de ROS

Com s'observa a la **figura 5**, la seleno-metionina presenta activitat antioxidant a concentracions de 1 mM i 100 µM. Mentre que a mesura que davalla la concentració d'aquest compost amb seleni es veu un augment progressiu dels nivells de ROS fins que pareix establitzar-se.

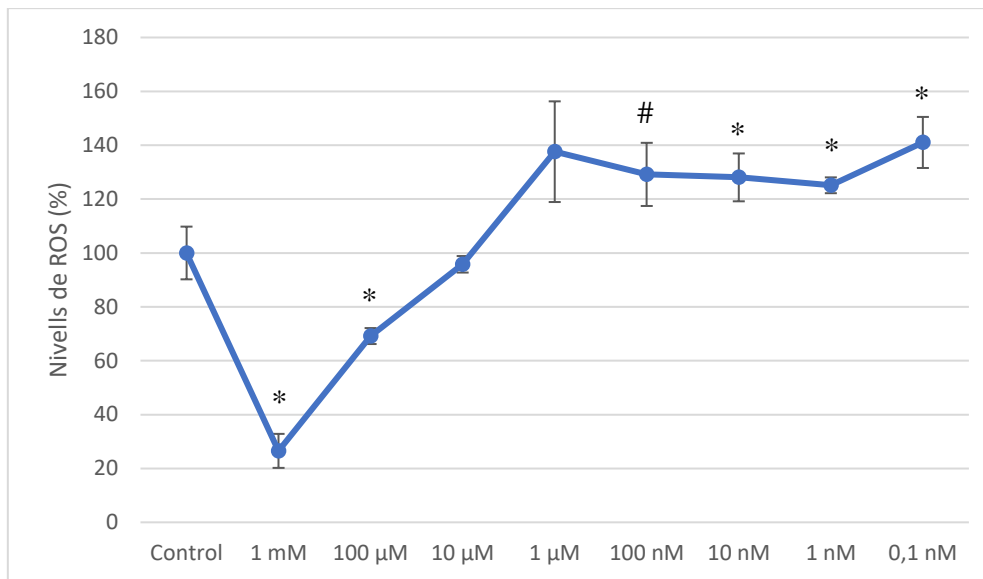


Figura 5. Mesura dels nivells de ROS a la línia cel·lular L6E9 emprant Se-Met. Els detalls de l'assaig es troben detallats a l'apartat de material i mètodes. $p_{1 \text{ mM SeMet}}=0,0006$; $p_{100 \text{ } \mu\text{M SeMet}}=0,014$; $p_{10 \text{ } \mu\text{M SeMet}}=0,69$; $p_{1 \text{ } \mu\text{M SeMet}}=0,21$; $p_{100 \text{ nM SeMet}}=0,068$; $p_{10 \text{ nM SeMet}}=0,035$; $p_{1 \text{ nM SeMet}}=0,035$; $p_{0,1 \text{ nM SeMet}}=0,013$. S'han emprat quadruplicats per a l'anàlisi dels nivells de ROS. * significa que hi ha diferència estadísticament significativa ($p < 0,05$). # significa diferències estadísticament significatives ($p \leq 0,1$).

L'expressió de la sirtuïna 3 pareix tenir una variació en resposta a Se-Met
 Quant als gens antioxidants estudiats (**figura 6**), pot apreciar-se com a concentracions de 10 μM no hi ha diferències estadísticament significatives en l'expressió de cap gen ($p_{Nrf2}=0,20$; $p_{Sirt3}=0,78$; $p_{Sod1}=0,51$; $p_{Sod2}=0,34$). Encara que a concentracions de 100 μM , tots quatre ($p_{Nrf2}=0,31$; $p_{Sod1}=0,32$; $p_{Sod2}=0,41$) tampoc mostren cap diferència estadísticament significativa, llevat de la tendència present a l'expressió de *Sirt3* ($p=0,07$).

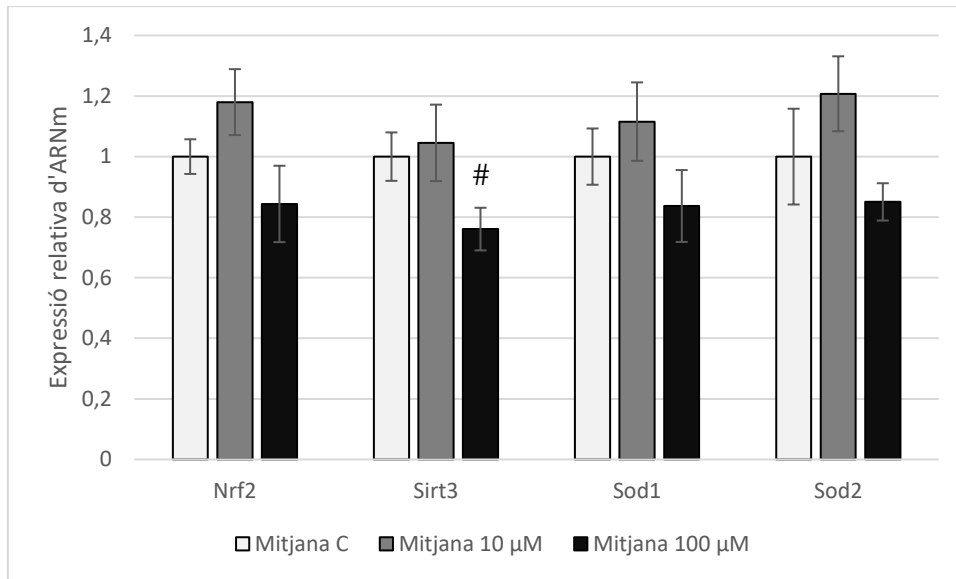


Figura 6. L'addició de Se-Met ha resultat en una reducció dels nivells d'expressió de la **Sirt3**. S'han emprat quadruplicats per a l'anàlisi de l'expressió de gens amb propietats antioxidants. # significa diferències estadísticament significatives ($p \leq 0,1$).

L'expressió de gens relacionats amb la funció mitocondrial es veu modulada en resposta a Se-Met

L'expressió de *Ppargc1a* sota concentracions de 100 µM ha resultat en una reducció significativa ($p=0,04$). De la mateixa manera, podem veure com l'expressió de *Mt-Co1* i *Cox4i1* minva de forma significativa ($p_{Mt-Co1}=0,02$ i $p_{Cox4i1}=0,02$). Per altra banda, com bé queda reflectit a la **figura 7**, no trobem diferències significatives per a *Tfam* ni cap dels gens esmentats a aquest apartat quan es varen tractar les cèl·lules amb un tractament de 10 µM de Se-Met ($p_{Ppargc1a}=0,76$; $p_{Tfam}=0,42$; $p_{Mt-Co1}=0,32$; $p_{Cox4i1}=0,98$).

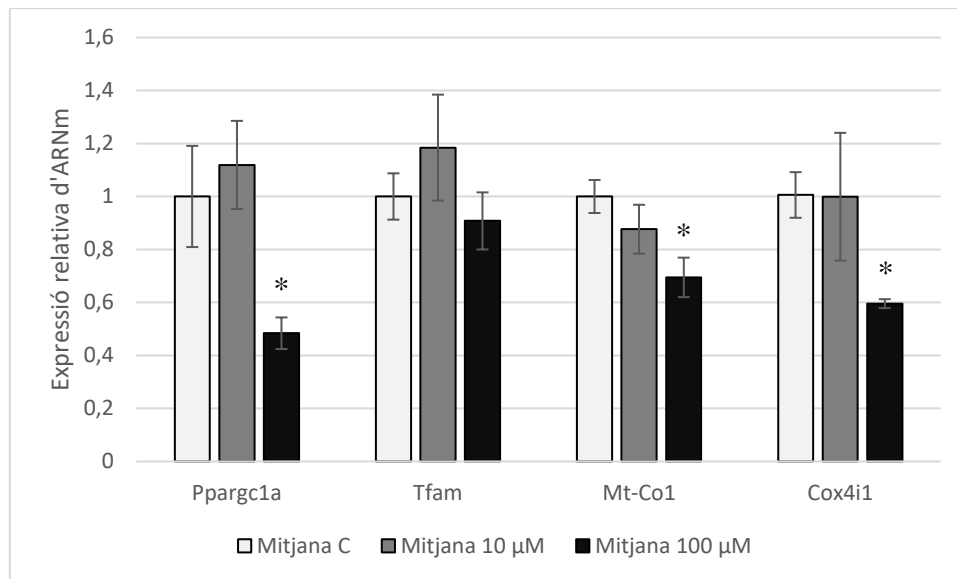


Figura 7. La Se-Met redueix l'expressió dels gens *Ppargc1a*, *Mt-Co1* i *CoXi4* en miòcits de rata. La línia cel·lular fou tractada amb concentracions de 10 μM i 100 μM de l'aminoàcid. S'han emprat quadruplicats per a l'anàlisi de l'expressió de gens relacionats amb la funció mitocondrial. * significa que hi ha diferència estadísticament significativa ($p < 0,05$).

L'expressió de certs gens implicats en la senescència es veuen modulats en resposta a Se-Met

Respecte a la resposta observada a gens relacionats amb la senescència (**Fig. 8**), s'ha trobat que a concentracions de 10 μM no hi ha diferències estadísticament significatives ($p_{Mtor}=0,95$; $p_{Sirt6}=0,62$; $p_{Tp53}=0,43$; $p_{Sqstm1}=0,31$; $p_{Cdkn1a}=0,43$; $p_{Cdkn2a}=0,30$). En comparació, quan s'ha emprat el tractament a concentracions de 100 μM no es mostra cap diferència estadísticament significativa per a l'expressió de cap gen ($p_{Cdkn2a}=0,31$; $p_{Sqstm1}=0,30$; $p_{Sirt6}=0,11$), exceptuant la del *Tp53* ($p=0,004$) que mostra un augment estadísticament significatiu de l'expressió gènica i dels gens *Mtor* ($p=0,10$) i *Cdkn1a* ($p=0,09$), els quals mostren una certa tendència a veure's reduïts amb aquest tractament.

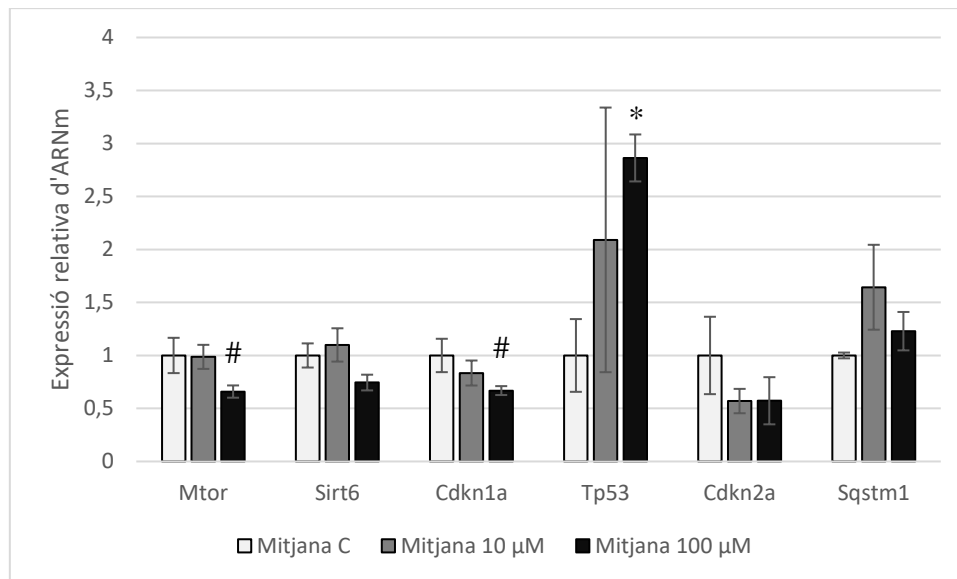


Figura 8. Se-Met produeix un augment en l'expressió de *Tp53*, mentre que té tendència a reduir les de *Mtor* i *Cdkn1a*. S'han emprat quadruplicats per a l'anàlisi de l'expressió de gens implicats amb la senescència. * significa que hi ha diferència estadísticament significativa ($p < 0,05$). # significa diferències estadísticament significatives ($p \leq 0,1$).

Discussió

En aquest estudi s'ha analitzat l'efecte de la Se-Met sobre la línia cel·lular L6E9 de múscul esquelètic de rata per a esbrinar si podria contribuir a millorar aspectes com la funció mitocondrial, la capacitat antioxidant i la senescència cel·lular. Vàrem triar les concentracions de 10 µM i 100 µM per a constatar les diferències que hi ha quan s'empra Se-Met amb efectes antioxidants i sense. Com s'ha pogut observar en els resultats, podem confirmar que la selenometionina és un aminoàcid amb activitat antioxidant, com afirmen altres autors en altres tipus cel·lulars (Pons et al., 2020; Wan et al., 2020).

A concentracions de 10 µM no s'han apreciat canvis significatius pel que fa als antioxidants, senescència i funció mitocondrial, però, en canvi, a concentracions de 100 µM sí que se n'han observat alguns. Així i tot, una reducció dels nivells de radicals lliures que s'ha traduït en una major viabilitat cel·lular, com també ho indiquen a Chen et al., 2021; Redman et al., 1998; Wan et al., 2019. A més, tot i no tenir prou evidències significatives d'expressió de gens antioxidants, sí que podem veure una reducció de l'expressió de gens implicats en la senescència, gens implicats en la senescència, el que al final podria significar que aquest seleno-aminoàcid podria contribuir a reduir el nombre de cèl·lules senescentes en una situació de sarcopènia. Per altra banda, a causa d'una limitació de l'estudi, no s'han pogut realitzar l'anàlisi de proteïna mitjançant Western Blot (WB) ni determinar l'activitat d'aquests enzims.

Si ens fixem en la funció mitocondrial, trobem una reducció de l'expressió de *Ppargc1a* seguida de *Mt-Co1* i *Cox4i1*. Aquest resultat té sentit, ja que el gen *Ppargc1a* és un dels

reguladors principals de la biogènesi mitocondrial. Si aquest es redueix, seria d'esperar que els altres dos gens també es vessin reduïts. Ara bé, aquest resultat no era el que esperàvem. A la nostra hipòtesi es pensava que afavoriria l'expressió d'aquests gens fent que s'estimulés la síntesi de nous mitocondris. Aquest fet es podria deure a diversos factors. El fet que hàgim aplicat aquest tractament de forma *in vitro* pot haver fet que les cèl·lules no necessitin generar molta energia, ja que es troben estàtiques al medi de cultiu i no han rebut cap estímul de contracció, a diferència del que passaria a un model animal. Tot i això, podem estar observant una conseqüència de l'efecte antioxidant de la seleno-metionina, ja que reduint l'expressió de gens relacionat amb la biogènesi mitocondrial s'estaria reduint el nombre de mitocondris, principals productors de radicals lliures. De la mateixa forma, esperàriem que la Sirt3 augmenti la seva expressió a models animals, perquè s'ha vist com l'exercici estimula el contingut proteic d'aquesta (Vargas-Ortiz et al., 2019), tot i que convé recordar que no s'han pogut realitzar anàlisis proteiques a aquest treball, prova que ens confirmaria si l'expressió d'aquesta sirtuïna es veu reduïda perquè ja n'hi ha suficient, si és una conseqüència del tractament, o si bé podria estar relacionat amb el subjecte de l'estudi. Encara i així volem fer èmfasi en el fet que són hipòtesis del que podria haver passat. Per a confirmar que el tractament redueix la biogènesi mitocondrial hauríem d'estudiar els nivells proteics de complexos mitocondrials, el conjunt de mitocondris per microscòpia o el consum d'oxigen, entre altres paràmetres.

La sobreexpressió resultant de Tp53 després del tractament, de forma preliminar, és sorprenent. Aquest és un dels guardians del cicle cel·lular i les cèl·lules que han estat emprades durant aquest experiment havien estat diferenciades de forma prèvia a l'administració del tractament, per tant, una citometria de flux seria necessària en posteriors estudis sobre l'efecte del seleno-aminoàcid sobre múscul esquelètic per a comprovar a quina fase del cicle cel·lular es troben. Per altra banda, hi ha literatura que esmena la capacitat de bloqueig que té Tp53 quan es troba sobreexpressada enfront del gen *Nrf2*. Segons Faraonio *et al.* (2006), s'ha demostrat que p53, a més de totes les seves funcions conegudes, és responsable de silenciar l'activitat de *Nrf2*, suggerint així, que "la resposta antioxidant de la cèl·lula es troba sota un control estricte a causa de les seves possibles conseqüències perjudicials".

El que queda clar és que p53 té un ampli rang de funcions, entre les quals es poden trobar implicacions tant amb la senescència, com amb la funció mitocondrial i l'estrès oxidatiu. Alguns exemples de les seves funcions relacionades amb la senescència són mostrades per Saleem et al. (2009), els quals observen com a ratolins que no presenten p53 mostren una massa muscular significativament major que a ratolins de tipus salvatges. De forma semblant, Beyfuss & Hood (2018) comenten com altres malalties com la diabetis poden induir la inhibició de vies que regulin p53, fent que aquesta s'acumuli de forma anormal i acabi induint l'apoptosi del teixit. Segons Mijijt et al. (2020), un cop s'indueix la detenció del creixement cel·lular i la

mort cel·lular programada, la p53 activada té la capacitat de modular la senescència, mostrant efectes aparents duals, en el que en certs casos promou i, en d'altres, inhibeix, el programa de senescència. Per tant, proposem que els nivells de p53 poden cursar senescència o no, però s'ha de tenir en compte si aquesta proteïna es troba acetilada o no.

Els principals reguladors de la senescència, Cdkn1a i Cdkn2a, no han mostrat cap augment, per consegüent, l'augment de p53 no sembla tenir cap efecte sobre aquest procés. De totes maneres, el nombre de cèl·lules senescent es podria determinar mitjançant un assaig de la β -galactosidasa.

Conclusions

En conclusió, la Se-Met és un aminoàcid amb propietats antioxidants a múscul cardíac de ratolí en funció de la seva concentració i no interfereix amb la viabilitat cel·lular quan és emprada a concentracions antioxidants. Aquest estudi ha mostrat una reducció significativa de l'expressió de gens relacionats amb la senescència i la funció mitocondrial, mentre que ha augmentat significativament l'expressió de *Tp53*. D'acord a les limitacions de l'experiment, es preveu que en un futur s'analitzi la quantitat de proteïna i l'activitat dels enzims antioxidants per a dilucidar els resultats reflectits aquí.

Agraïments

M'agradaria agrair a la Dra. Lida Torrens i al Grup Multidisciplinari d'Oncologia Translacional per haver-me permès fer aquest treball amb ells i per totes les tècniques i coneixements que m'han ensenyat.

Per altra banda, agrair als meus pares per haver-me permès cursar aquests estudis i a totes les amistats que he fet aquests anys, per fer-me les tardes més amenes i fer-me gaudir un poc més d'aquesta etapa universitària.

Bibliografia

- Adhihetty, P. J., Uguccioni, G., Leick, L., Hidalgo, J., Pilegaard, H., & Hood, D. A. (2009). The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297(1), 217-225. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2009>
- Baek, K. W., Jung, Y. K., Park, J. S., Kim, J. S., Hah, Y. S., Kim, S. J., & Yoo, J. Il. (2021). Two types of mouse models for sarcopenia research: Senescence acceleration and genetic modification models. *Journal of Bone Metabolism*, 28(3), 179-191. <https://doi.org/10.11005/JBM.2021.28.3.179>
- Beyfuss, K., & Hood, D. A. (2018). A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Report*, 23(1), 100-117. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1416773>
- Burk, R. F., Hill, K. E., & Motley, A. K. (2001). Plasma selenium in specific and non-specific forms. *BioFactors*, 14(1-4), 107-114. <https://doi.org/10.1002/biof.5520140115>

- Chen, J., Zhang, Y., Lv, Y., Tian, M., You, J., Chen, F., Zhang, S., & Guan, W. (2021). Effects of Selenomethionine on Cell Viability, Selenoprotein Expression and Antioxidant Function in Porcine Mammary Epithelial Cells. *Frontiers in Nutrition*, 8(July), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.665855>
- Childs, B., Durik, M., Baker, D. et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine* 21, 1424–1435 (2015). <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P., & Leeuwenburgh, C. (2009). Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 8(1), 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.07.002>
- Cruz-Jentoft, A. J., & Sayer, A. A. (2019). Sarcopenia. *The Lancet*, 393(10191), 2636-2646. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31138-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31138-9)
- Deepa, S. S., Van Remmen, H., Brooks, S. V., Faulkner, J. A., Larkin, L., McArdle, A., Jackson, M. J., Vasilaki, A., & Richardson, A. (2019). Accelerated sarcopenia in Cu/Zn superoxide dismutase knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 132(July 2018), 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.032>
- Faraonio, R., Vergara, P., Di Marzo, D., Pierantoni, M. G., Napolitano, M., Russo, T., & Cimino, F. (2006). p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39776-39784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605707200>
- Foreman, N. A., Hesse, A. S., & Ji, L. L. (2021). Redox signaling and sarcopenia: Searching for the primary suspect. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169045>
- He, Y., Xie, W., Li, H., Jin, H., Zhang, Y., & Li, Y. (2022). Cellular Senescence in Sarcopenia: Possible Mechanisms and Therapeutic Potential. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(January), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.793088>
- Mariappan, N., Elks, C. M., Fink, B., & Francis, J. (2009). TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(4), 462-470. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.049>
- Meng, S. J., & Yu, L. J. (2010). Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1509-1526. <https://doi.org/10.3390/ijms11041509>
- Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. (2020). Role of p53 in the regulation of cellular senescence. *Biomolecules*, 10(3), 1-16. <https://doi.org/10.3390/biom10030420>
- Mikula, M., Dzwonek, A., Henning, E. E., & Ostrowski, J. (2005). Increased mitochondrial gene expression during L6 cell myogenesis is accelerated by insulin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(9), 1815-1828. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.008>
- Poulsen, J. C. N., Harris, P., Jensen, K. F. & Larsen, S. (2001). Selenomethionine substitution of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase causes a change in crystal contacts and space group. *Acta Crystallographica*, D57, 1251-1259. <https://doi.org/10.1107/S0907444901010393>
- Pons, D. G., Moran, C., Alorda-Clara, M., Oliver, J., Roca, P., & Sastre-Serra, J. (2020). Micronutrients Selenomethionine and Selenocysteine Modulate the Redox Status of MCF-7 Breast Cancer Cells. *nutrients*, 12(3), 865-875. <https://doi.org/10.1177/030089165604200413>
- Redman, C., Scott, J. A., Baines, A. T., Basye, J. L., Clark, L. C., Calley, C., Roe, D., Payne,

- C. M., & Nelson, M. A. (1998). Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Letters*, *125*(1-2), 103-110. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00497-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00497-7)
- Reid, M. B., & Li, Y. P. (2001). Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: A cellular perspective. *Respiratory Research*, *2*(5), 269-272. <https://doi.org/10.1186/rr67>
- Saleem, A., Adhietty, P. J., & Hood, D. A. (2009). Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiological Genomics*, *37*(1), 58-66. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90346.2008>
- Schrauzer, Gerhard N. (2000). Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition*, *130*(7), 1653-1656. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1653>
- Schrauzer, Gerhard Norbert. (2003). The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Advances in Food and Nutrition Research*, *47*, 73-112. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(03\)47002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)47002-2)
- Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., & Barrientos, A. (2018). Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *76*, 163-178. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.055>
- Tominaga, K., & Suzuki, H. I. (2019). TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205002>
- Vargas-Ortiz, K., Pérez-Vázquez, V., & Macías-Cervantes, M. H. (2019). Exercise and sirtuins: A way to mitochondrial health in skeletal muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(11), 1-11. <https://doi.org/10.3390/ijms20112717>
- Vigneron, A., & Vousden, K. H. (2010). p53, ROS and senescence in the control of aging. *Aging*, *2*(8), 471-474. <https://doi.org/10.18632/aging.100189>
- Wan, X., Ju, G., Xu, L., Yang, H., & Wang, Z. (2020). Selenomethionine Improves Antioxidant Capacity of Breast Muscle in Geese Via Stimulating Glutathione System and Thiol Pool. *Biological Trace Element Research*, *198*(1), 253-259. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02052-8>
- Wan, X. L., Ju, G. Y., Xu, L., Yang, H. M., & Wang, Z. Y. (2019). Dietary selenomethionine increases antioxidant capacity of geese by improving glutathione and thioredoxin systems. *Poultry Science*, *98*(9), 3763-3769. <https://doi.org/10.3382/ps/pez066>