

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Factores nutricionales que modulan la progresión de la pérdida auditiva
asociada al envejecimiento en el ratón:
ácido fólico y ácidos grasos omega-3**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

Raquel Martínez Vega

Directores

Isabel Varela Nieto
Rafael Cediél Algovia
María de los Ángeles Pajares Tarancón

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



FACTORES NUTRICIONALES QUE MODULAN LA PROGRESIÓN DE LA PÉRDIDA AUDITIVA ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO EN EL RATÓN: ÁCIDO FÓLICO Y ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Raquel Martínez Vega

Bajo la dirección de los doctores

Isabel Varela Nieto

Rafael Cediél Algovia

María de los Ángeles Pajares Tarancón

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria



**FACTORES NUTRICIONALES QUE MODULAN
LA PROGRESIÓN DE LA PÉRDIDA AUDITIVA
ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO EN EL
RATÓN: ÁCIDO FÓLICO Y ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3**

TESIS DOCTORAL

Raquel Martínez Vega

Madrid, 2015



La Prof.^a Dra. Dña. Isabel Varela Nieto, el Prof. Dr. Don Rafael Cediél Algovia y la Prof.^a Dra. Dña. María de los Ángeles Pajares Tarancón certifican que:

Dña. Raquel Martínez Vega, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada: “FACTORES NUTRICIONALES QUE MODULAN LA PROGRESIÓN DE LA PÉRDIDA AUDITIVA ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO EN EL RATÓN: ÁCIDO FÓLICO Y ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3”. Este trabajo, que presenta para optar al título de Doctor, ha sido realizado en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid (CSIC-UAM).

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 26 de Enero de 2015.

Vº Bº Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Isabel Varela Nieto Fdo.: Rafael Cediél Algovia Fdo. María de los Ángeles Pajares Tarancón

A mis padres Santos y Benigna

A mi hermana, María Jesús

*“Blindness separates us from things,
but deafness separates us from people.”*

Helen Keller

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar me gustaría mostrar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Isabel Varela por haberme abierto las puertas de su laboratorio cuando más perdida me encontraba, darme esta gran oportunidad y convertirme en parte de su maravilloso equipo. En segundo lugar quisiera agradecer al Dr. Cediél por su paciencia a la hora de enseñarme, por las muchas horas de quirófano juntos en mi época de interna, las horas de café y todas esas conversaciones cada una de las cuáles me ha servido para ser un poquito más sabia. Quisiera agradecer también a la Dra María de los Ángeles Pajares por las muchas horas de enseñanza y paciencia, por todas las determinaciones hechas y porque sin ella el ciclo de la metionina habría sido una odisea aún mayor para mí. Gracias a los tres, de corazón.

- A la Dra. Karen Steel, por acogerme en su laboratorio y enseñarme tantas cosas útiles tanto a nivel científico como personal. A Zahra, Bea, Neil, Annalisa, Jo, Jenny, Selina por todo lo que me habéis enseñado pero también por todos esos “*Tea-breaks*” y esos pasteles compartidos juntas.

- A Gregorio y a Teresa, por todo lo que he aprendido de nutrición gracias y ellos y por su trabajo con las determinaciones de metabolitos en sangre y con las dietas. También gracias al Dr. Francisco Garrido por todos los *western blotting* del ciclo y por su buen humor, te deseo la mejor jubilación posible.

- Este trabajo ha sido realizado con el apoyo del programa predoctoral JAE-CSIC. Asimismo, la financiación del trabajo ha sido posible gracias a los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-24391), la Unión Europea (FP7-AFHELO y TARGEAR) y Puleva Biofood.

- Gracias también a los revisores europeos Marcelo Rivolta y Mercedes García por sacar tiempo de dónde no lo hay para revisar este trabajo.

- Nunca podré agradecerérselo lo suficiente a mis padres y a mi hermana, porque a lo largo de estos años han tenido la paciencia y los consejos necesarios en cada instante para esos momentos de bajón y de subidón por los que todos los doctorandos acabamos pasando. Esta tesis es por y para vosotros.

- Gracias en especial también a mi tía Dolores (Lola) por su inestimable ayuda con la corrección del texto y por todos sus consejos para enriquecer mi léxico.

- A todos en el 2.11. Gracias a las que han volado a otros lugares, María, Lupe, y gracias a las que han estado ahí desde el principio. Gracias Lou por escucharme y

aconsejarme, eres una amiga. Gracias a Silvia y al ENNI por las enseñanzas con el TDT y todos los “trastitos” del ENNI, por tu apoyo constante en todo y por tantas otras cosas más. Gracias Marta, por esos momentos compartidos juntas en congresos y mesa a mesa, por ser tan sabia y darme siempre tan buenos consejos. Os estaré siempre agradecida. Gracias a Rocío por esas conversaciones de nuestro “corner” y a Ada por cuestionarse todo siempre y por esa mente tan curiosa que nos invita a todos a seguir indagando. Por supuesto gracias a los chicos también, porque junto a vuestro conocimiento, sois vosotros los que ponéis ese puntito de testosterona indispensable para nuestra salud mental.

-A toda la gente del IIB. Empezando por Carlos y Diego y terminando por los servicios de informática e imagen. Gracias en especial a Javier por sus dibujos. A Ana y Lola, las chicas de confo por todas esas horas juntas. Gracias, a todos.

- A mis veterinarios: Miguel, Marina, Lorena, Lucía, León, Pedro, Clara, María, Jorge, Isa, Jose, Blanca, Toni, Cris, Elena, Fidel, Rafa, Laura, Noe y a mis no tan veterinarios, Guille y Laura, por “presionarme” con la tesis y estar siempre ahí cuando os he necesitado. Perdonadme si me olvido de alguno, sabéis que os quiero un montón a todos y que de un modo u otro, todos habéis contribuido a esta tesis.

- A mis “otros” amigos: Álex, Luis, Cris, Isma, Montse, Raúl, Juan, David, Rocío, Celia, Fran, Joaquín, Tamara, los pinteños...gracias por entender todas esas veces por qué no he podido estar con vosotros cuando la tesis me reclamaba.

- Joaco, gracias por apoyarme en esta última etapa de tesis y gracias por hacerme sonreír siempre que lo he necesitado. Me siento afortunada por el mero hecho de haberte conocido.

- A Luis, porque aunque nunca podrás ver cómo ha terminado esta aventura, tú fuiste el primero en animarme a embarcarme en esto, y, allá donde estés, te estaré siempre eternamente agradecida. *Toys toys toys.*

- Por último, pero no por ello menos importante, a mis chicos y chicas del coro, a Carmen, a Malela, al Orfeón de Malasaña y a “*El Molino Escuela de Artes*” en general, porque sin ellos estos dos últimos años no habrían sido lo mismo.

A todos aquellos que se han cruzado en mi camino, a los que ya no están, a los están por llegar, a todos, GRACIAS y nos vemos muy pronto.

Raquel

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	7
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN.....	19
1. Anatomía y fisiología del oído	21
2. Mecanismo de transmisión del sonido.....	28
3. Pérdida auditiva	29
3.1. Definición de sordera.....	29
3.2. Prevalencia y consecuencias de la sordera	30
3.3. Etiología de la sordera: presbiacusia	31
4. El ácido fólico: historia y estructura química	32
4.1. Ciclo de los folatos	34
4.2. Folato y Homocisteína.....	36
4.3. Deficiencia en folato.....	38
5. Ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6: historia	39
5.1. Ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6: estructura química.....	40
5.2. Metabolismo de los ácidos grasos	43
5.3. Ácidos grasos e inflamación.....	45
6. Nutrición, envejecimiento y sordera.....	48
6.1. Folato, envejecimiento y sordera.....	49
6.2. Omega-3, envejecimiento, inflamación y sordera	50
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
MATERIALES	61
MÉTODOS.....	61
1. Animales	61
2. Modelos y dietas	62
2.1 Modelo de envejecimiento auditivo normal	62
a) Modelo de dieta deficiente: CBA/Ca.....	62
2.2 Modelos de envejecimiento auditivo prematuro	62
a) Modelo de dieta deficiente: C57BL/6J	62

b) Modelo de dieta suplementada: C57BL/6J	62
3. Procedimientos experimentales no invasivos	65
3.1 Control de peso	65
3.2 Evaluación auditiva	65
3.2.1 Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC; auditory brainstem response, ABR)	65
3.2.2 Emisiones Otoacústicas (EOA) y Productos de distorsión de emisiones otoacústicas (PDEOA o DPOAE en inglés)	68
4. Procedimientos experimentales invasivos para toma de muestras biológicas.	69
4.1 Extracción de sangre y muestras frescas de tejido.....	69
4.2 Extracción de la cóclea/oído interno para análisis histológico.....	69
4.3 Extracción de otras muestras para análisis histológico.....	70
5. Preparación y obtención de las secciones histológicas.....	70
5.1 Criopreservación y congelación	70
5.2 Inclusión en parafina.....	71
5.3 Microtomía	71
6. Procesamiento y análisis de las muestras	71
6.1 Determinación de niveles de metabolitos en sangre.....	72
6.1.1 Determinación de los niveles de homocisteína.....	72
6.1.2 Determinación de los niveles de folato.....	72
6.1.3 Determinación de los niveles de vitamina B6	73
6.2 Preparación y tinción de las extensiones de sangre y médula ósea	73
6.3 Estudio hematológico	74
6.4 Técnicas de inmunodetección.....	74
6.4.1 Inmunohistoquímica en cortes de parafina	74
6.4.2 Inmunohistoquímica en cortes de congelado y en <i>whole mount</i>	75
6.4.3 Microscopía, análisis estadístico y cuantificación celular	76
6.5 Detección de la muerte celular mediante TUNEL.....	76
6.5.1 Microscopía y cuantificación celular.....	77
6.6 Determinación de los niveles de glutatión.....	77
6.7 Extracción de proteínas y <i>Western Blotting</i>	77
6.8 Extracción de ARN y reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-qPCR).....	79

6.9 Análisis estadístico	80
RESULTADOS	85
I. Estudio del efecto de la dieta deficiente en ácido fólico en ratones C57	87
1. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el peso a los 4 meses de edad	87
2. Efecto del déficit en ácido fólico sobre los niveles de homocisteína, folato y vitamina B6 a los 4 meses de edad	87
3. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la función auditiva a los 4 meses de edad.....	89
4. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la morfología coclear a los 4 meses de edad.....	94
5. Perfil de expresión de las enzimas del metabolismo de la metionina en la cóclea	100
6. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el ciclo de la metionina en la cóclea a los 4 meses de edad.....	102
7. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el equilibrio oxidativo de la cóclea a los 4 meses de edad.....	105
II. Estudio del efecto de la dieta deficiente en ácido fólico en ratones CBA.....	109
1. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el peso a los 10 meses de edad ...	109
2. Efecto del déficit en ácido fólico sobre los niveles de homocisteína y folato a los 10 meses de edad.....	109
3. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el perfil hematológico a los 10 meses de edad.....	112
4. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la función auditiva a los 10 meses de edad.....	115
5. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la morfología coclear a los 10 meses de edad	122
III. Estudio del efecto de la dieta suplementada con ácidos grasos omega-3 en ratones C57	125
1. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre el peso a los 10 meses de edad.....	125
2. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre los niveles de homocisteína y folato a los 10 meses de edad	125
3. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre la función auditiva a los 7 y 10 meses de edad	128
4. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre la morfología coclear a los 7 meses de edad	135

5. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre el ciclo de la metionina en la cóclea a los 10 meses de edad.....	137
6. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre el estado inflamatorio de la cóclea a los 10 meses de edad.....	140
DISCUSIÓN.....	143
I. El metabolismo de la metionina tiene características especiales en la cóclea.....	146
II. El déficit en ácido fólico causa una aceleración de la pérdida auditiva asociada al envejecimiento.....	146
a. El déficit en folato causa un desequilibrio en el metabolismo de la metionina a nivel de la cóclea	149
b. El déficit en folato causa un desequilibrio del estrés oxidativo en la cóclea	151
III. La suplementación con ácidos grasos omega-3 ralentiza la aparición de la sordera neurosensorial asociada al envejecimiento.....	154
a. La suplementación con ácidos grasos omega-3 reduce los niveles de inflamación	155
b. El metabolismo de la metionina en la cóclea está mejor preservado tras la suplementación con ácidos grasos omega-3.....	160
CONCLUSIONES.....	163
CONCLUSIONS	167
BIBLIOGRAFÍA	169
ANEXO 1	201

RESUMEN

Introducción

El descenso en la funcionalidad del organismo como consecuencia del envejecimiento está asociado con la aparición de una variedad de enfermedades crónicas que incluyen el cáncer, la diabetes, la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares. El tratamiento de estos trastornos representa un grave problema socioeconómico en la mayor parte de las poblaciones envejecidas, como las de los países occidentales, donde la demanda global de tratamientos terapéuticos ha aumentado dramáticamente con la industrialización y la esperanza de vida. Además, de manera concomitante al proceso de envejecimiento, se observa una discapacidad multisensorial progresiva, siendo la medida de la función auditiva una de las propuestas para su uso como marcador del descenso cognitivo.

De acuerdo con los datos publicados recientemente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 360 millones de personas en el mundo padecen sordera de moderada a profunda. La incidencia de la sordera varía en función del sector poblacional. Así, mientras que en el sector infantil afecta aproximadamente a un 10% de la población, este porcentaje aumenta hasta el 30% en la población adulta con más de 65 años, incrementando exponencialmente a partir de esta edad. La pérdida auditiva puede deberse a factores ambientales, genéticos o a una combinación de ambos. La pérdida auditiva asociada al envejecimiento o presbiacusia se considera una sordera con un origen multifactorial, viéndose involucrados tanto factores genéticos como ambientales. Además, en contraste con la sordera congénita, no se conocen apenas los factores genéticos que contribuyen a la presbiacusia, derivándose la mayor parte de la información disponible de los estudios realizados en modelos animales.

Dentro de los posibles factores asociados a la pérdida auditiva, se encuentran los nutricionales y, entre ellos, la insuficiencia alimentaria o metabólica de vitaminas o sus precursores. Una de estas moléculas es el folato, vitamina que ha de ingerirse como parte habitual de la dieta dado que el hombre no es capaz de sintetizarla. Los folatos se encuentran en abundancia en muchos alimentos, entre los que se hallan los vegetales de hoja verde, algunas frutas, los huevos, los mariscos, la carne de cerdo, las aves de

corral, el hígado o el riñón. Muy poco tiempo tras la síntesis de esta molécula se vio que resultaba efectiva en el tratamiento de las anemias megaloblásticas de todos los tipos, siendo particularmente útil en aquellas relacionadas con gestación o malnutrición. El folato que permanece en el interior celular, va a tener un papel metabólico como donante y receptor de unidades de carbono. La transferencia de estas unidades de carbono durante el ciclo de los folatos, es esencial en muchos procesos entre los que se encuentran la síntesis de purinas y pirimidinas para la formación de ácidos nucleicos, las reacciones de metilación, el metabolismo de los aminoácidos y la síntesis de mielina o de neurotransmisores. El nodo metabólico de unión entre los ciclos del folato y la metionina, y la vía de transulfuración, es la homocisteína (Hcy). Una de las formas de eliminación del aminoácido azufrado Hcy es mediante la remetilación a metionina. Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la metionina sintasa (MTR) y la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT), que emplean 5'-metiltetrahidrofolato y betaína, respectivamente, como donantes de grupos metilo. La metionina generada se emplea para la síntesis de S-adenosilmetionina, el principal donante en los procesos de transmetilación celular. El correcto funcionamiento de esta ruta depende así del suministro constante de 5'-metiltetrahidrofolato, que se recicla en el ciclo de los folatos. Varios tipos de sordera, incluyendo la sordera asociada al envejecimiento y la sordera por ruido, se han asociado con niveles bajos de folato en glóbulos rojos y suero en pacientes. Además, algunos estudios han mostrado la relación directa entre niveles inadecuados de ácido fólico con un mayor grado de pérdida auditiva. Asimismo, estudios en varios modelos animales han generado una serie de datos, que tomados en conjunto, apoyan la hipótesis de que la deficiencia en ácido fólico y el metabolismo de la homocisteína juegan un papel clave en las alteraciones auditivas.

Existen muchos agentes que causan sordera e inducen inflamación y problemas de microvascularización. Numerosos estudios, realizados con el objetivo de paliar el efecto de estos agentes, han encontrado que ciertos nutrientes, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), poseen una gran capacidad anti-inflamatoria y vasodilatadora. Los omega-3 y omega-6 son PUFAs esenciales precursores de ácidos grasos de cadena larga. Existen tres tipos de PUFAs implicados en la fisiología humana: el ácido α -linolénico o ALA (aceite vegetal: algas), el ácido eicosapentaenoico o EPA y el ácido docosahexaenoico o DHA (origen animal: aceites de pescado, de huevo o de calamar).

Los PUFAs, a su vez, poseen funciones energéticas y estructurales en las membranas celulares, y controlan el metabolismo de los eicosanoides, que intervienen en procesos tan importantes como la inflamación o la señalización celular. En este trabajo nos hemos centrado en los ácidos grasos omega-3. Como consecuencia del efecto antiinflamatorio que estos ácidos grasos han mostrado en muchos estudios en relación con patologías como las enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, en los últimos años se han llevado a cabo estudios en los que se ha buscado el posible efecto de estas moléculas sobre la sordera en pacientes.

En conjunto, los datos epidemiológicos obtenidos en estudios llevados a cabo con el ácido fólico y los ácidos grasos omega-3 sugieren la existencia de una relación entre estas moléculas y la sordera. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a esta relación aún no han sido estudiados.

Objetivos y métodos

En el presente trabajo se ha utilizado el ratón (*Mus musculus*) como especie modelo para estudiar el impacto del déficit de ácido fólico y la suplementación con ácidos grasos omega-3 en la dieta sobre la progresión de la pérdida auditiva asociada al envejecimiento y en el metabolismo coclear.

Los dos primeros modelos experimentales de ratón descritos en este trabajo se centran en el estudio de la deficiencia nutricional de folatos a los 4 y 10 meses de edad. Por un lado se empleó un modelo de pérdida auditiva prematura, el ratón C57BL/6J, y por otro un modelo de pérdida auditiva normal, el ratón CBA/Ca. Se realizó un seguimiento de la función auditiva mediante las técnicas de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC o ABR, por sus siglas en inglés) y productos de distorsión de emisiones otoacústicas (PDEOA o DPOAE, en inglés). En paralelo, se llevó a cabo el estudio de la evolución de la citoarquitectura coclear mediante técnicas histológicas, inmunológicas y bioquímicas. Asimismo, la metodología empleada incluyó una batería muy extensa de pruebas entre las que se encuentran: el estudio de metabolitos a nivel local y sistémico, el estudio hematológico o el estudio de la expresión de genes y niveles de enzimas relacionados con el metabolismo de la homocisteína y el grado de estrés oxidativo en la cóclea.

La última parte de este trabajo se centró en el estudio del efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la pérdida auditiva asociada al envejecimiento. Para este tercer experimento de intervención nutricional, se empleó un modelo de pérdida auditiva prematura, el ratón C57BL/6J, y se llevó a cabo un estudio de suplementación dietética comparando los efectos de dietas control o con omega-3 sobre la función auditiva hasta los 10 meses de edad empleando las técnicas previamente mencionadas. Además de esto, se estudió el metabolismo de la homocisteína a nivel coclear y una serie de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación con el fin de conocer más a fondo el posible mecanismo involucrado en la prevención de la pérdida auditiva.

Resultados y conclusiones

El estudio de la pérdida auditiva es uno de los campos en los que los ensayos de intervención nutricional pueden tener mayor potencial preventivo. Por un lado, estudios epidemiológicos realizados a nivel mundial han mostrado una asociación entre la deficiencia en varios nutrientes esenciales, entre los que se encuentran los folatos, y la pérdida auditiva. Por otro lado, estudios de intervención dietética han mostrado la existencia de prevención auditiva o atenuación de la sordera en pacientes suplementados, entre otros, con ácido fólico, ácidos grasos poliinsaturados omega-3 o D-metionina.

En este trabajo se muestran una serie de características especiales del metabolismo de la metionina en la cóclea del ratón pues esta estructura presentó un perfil de expresión de genes y enzimas de este ciclo propio de los tejidos extra-hepáticos con una serie de características propias que convierten a la cóclea en un tejido único.

Los resultados obtenidos para el primer modelo experimental indican que el déficit de ácido fólico acelera el envejecimiento auditivo del ratón C57BL/6J que es *per se* un modelo de pérdida auditiva prematura. Esta sordera progresiva se acompañó de una marcada pérdida de células en la cóclea, así como también de una alteración del patrón normal de expresión de ARNm y proteínas del ciclo de la metionina, hasta causar hiperhomocisteinemia, conduciendo estos cambios hacia una menor protección de la estría vascular. Además, la ingesta insuficiente de ácido fólico en la dieta provocó un desequilibrio del estrés oxidativo coclear.

En una segunda fase se abordó el estudio del déficit nutricional en ácido fólico en ratonas CBA/Ca, estirpe que muestra un envejecimiento auditivo normal. Estos animales mostraron un deterioro acelerado de la condición corporal con respecto a la pérdida auditiva observada, la cual a los diez meses, edad más avanzada estudiada, fue aún leve.

Por último, el estudio de la suplementación dietética con ácidos grasos omega-3, en el modelo de ratón C57BL/6J de pérdida auditiva prematura, mostró un retardo en la aparición de la sordera neurosensorial asociada al envejecimiento. Por el contrario, en los animales con dieta control a los 10 meses de edad el envejecimiento se asoció con el aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y el descenso en las anti-inflamatorias. Este proceso no se apreció, en cambio, en los animales suplementados con ácidos grasos omega-3. Esto sugiere que los ácidos grasos omega-3 tienen un papel anti-inflamatorio y neuroprotector, ya sea directa o indirectamente, en el envejecimiento auditivo. Asimismo, el incremento en la eliminación de Hcy a través de la vía de la transulfuración observado en las cócleas del grupo control, se compensó con la dieta suplementada en omega-3 mediante el incremento en la remetilación por BHMT con el fin de preservar el flujo a través del ciclo de la metionina y unos niveles de homocisteinilación proteica normales.

Los resultados obtenidos en el trabajo aquí presentado apuntan al papel clave de la BHMT en la regulación de los niveles de Hcy en la cóclea. Además, todos los cambios observados sugieren que la intervención nutricional para controlar los niveles de homocisteína podría ser una nueva vía de prevención de la pérdida auditiva.

Palabras clave

Presbiacusia, restricción dietética, pérdida celular, apoptosis, suplementación dietética, inflamación, estrés oxidativo, hiperhomocisteinemia, ciclo de la metionina

SUMMARY

Introduction

The decline in the functionality of the organism as a consequence of ageing is associated with the onset of chronic diseases including cancer, diabetes, osteoporosis and cardiovascular diseases. The treatment of these disorders is a serious socioeconomic problem in most of the aged populations, such as those of the Western countries, where the global demand for therapeutic treatments has increased dramatically due to industrialization and life expectancy growth. Furthermore, concomitantly with the aging process, a progressive multisensory disability emerges. For this reason, the assessment of the auditory function, among others, has been proposed as a marker to assess cognitive decline.

According to recent World Health Organization (WHO) data, moderate-to-profound hearing loss affects over 360million people worldwide. Its incidence depends on the population segment studied. Thus, while hearing loss affects approximately 10% of children, this percentage rises up to 30% in adults over 65 years old, increasing further with age. Hearing loss can be caused by genetic and environmental factors, or their combination. The origin of age-related hearing loss (ARHL) or presbycusis has been considered as multifactorial where both genetic and environmental factors are involved. In contrast with congenital hearing loss, the genetic factors that contribute to age-related hearing loss, are yet to be discovered, most of the available information being derived from the studies conducted in animal models.

Nutritional factors are amongst some of the elements that have been related to hearing loss, being the metabolic insufficiency of essential nutrients and their precursors one of the most common. Folate belongs to this category of molecules. This vitamin has to be incorporated as a regular part of the diet since humans cannot synthesize it. Folates are abundant in many foods including green leafy vegetables, some fruits, eggs, seafood, pork, poultry, liver or kidney. Shortly after this molecule was first synthesized, its effectiveness against all types of megaloblastic anemias was proven, being particularly useful in those anemias related to pregnancy or malnutrition. During its metabolism the folate remaining in the interior of the cell will have a metabolic role as

donor and receiver of carbon units. The transfer of these units is essential in many processes like the synthesis of purines and pyrimidines for the formation of nucleic acids, methylation reactions, the amino acid metabolism and the synthesis of neurotransmitters or myelin. Homocysteine (Hcy) constitutes a metabolic branch point linking the methionine and folate cycles and the transsulfuration pathway. A way to eliminate this amino acid is through its remethylation to methionine. This reaction is catalyzed by either cobalamin-dependent methionine synthase (MTR) or betaine homocysteine methyltransferase (BHMT), enzymes that use 5'-methyltetrahydrofolate and betaine as methyl donors, respectively. Both reactions generate methionine that is, in turn, used to synthesize S-adenosylmethionine, the main methyl donor for cellular transmethylation. The correct function of the pathway depends on a continuous supply of 5'-methyltetrahydrofolate that is recycled in the folate cycle. Several epidemiological studies have shown an association of low levels of folate in serum and red cells with diverse types of hearing loss, including presbycusis and noise-induced hearing loss. In addition to this, numerous studies have shown a direct relationship between insufficient levels of folate and a higher degree of hearing loss. Besides, studies conducted in animal models have generated data that, collectively taken, support the hypothesis that folate and homocysteine metabolisms have a central role in hearing pathophysiology. However, the mechanisms by which cochlear function is affected remain poorly understood.

There are a number of agents that cause hearing loss and induce inflammation and microvascularization problems. Several studies have been conducted with the purpose of palliating the effect of these agents finding that certain nutrients, like polyunsaturated fatty acids (PUFAs), have a great anti-inflammatory and vasodilatory capacity. The omega-3 and omega-6 are essential PUFAs precursors of long chain fatty acids. There are three types of PUFAs involved in human physiology: the α -linolenic or ALA (oil of vegetable origin: algae), the eicosapentaenoic acid or EPA and the docosahexaenoic acid or DHA (oil of animal origin: fish oil, eggs and squid). PUFAs also have energy and structural functions on cellular membranes and are the molecules responsible for eicosanoid metabolism. Eicosanoids are implicated in very important processes for the body such as inflammation or cell signaling. The present work is exclusively focused on omega-3 fatty acids.

Studies investigating the possible effect of these molecules on hearing loss in patients have been conducted, specially, as a consequence of the anti-inflammatory effect shown by these fatty acids in studies related to numerous pathologies including cardiovascular and neurodegenerative diseases.

Altogether, the epidemiological data obtained so far from folic acid and omega-3 fatty acids studies suggest that there is a relationship between these molecules and deafness. However, the molecular mechanisms that might mediate their actions are yet to be discovered.

Objectives and methods

In the current work, the mouse (*Mus musculus*) has been used as the model species to study the impact of folic acid deficiency and omega-3 fatty acid supplementation in the diet over the progression of age-related hearing loss and cochlear metabolism.

The first two mice experimental models described in this work focus on the study of the nutritional deficiency of folate at 4 and 10 months of age. On the one hand, the C57BL/6J mouse, which is a common model of premature hearing loss, was used. On the other hand, the CBA/Ca mouse was used as a model of regular hearing loss. A follow up of the auditory function was performed using auditory brainstem evoked potentials (ABR) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) techniques. In parallel, the study of the cochlear cytoarchitecture was carried out engaging histological, immunological and biochemical techniques. Moreover, an extensive range of tests were involved in the used methodology including the study of: local and systemic levels of metabolites, the hematological profile or the study of the enzymes and gene expression changes related to the metabolism of methionine and the degree of oxidative stress in the cochlea

The last part of this work focused on the study of the effect of omega-3 fatty acids on age-related hearing loss. The C57BL/6J, model of premature hearing loss as previously described, was used for this third part. This study consisted in the comparison of the effects of control and omega-3 supplemented diets on hearing function for a 10- month period, using the techniques mentioned above. Additionally,

the methionine metabolism at a cochlear level, together with a series of oxidative stress and inflammation biomarkers were studied in order to unveil the possible mechanisms involved in the prevention of hearing loss.

Results and conclusions

The study of hearing loss is one of the fields where nutritional intervention could have a larger potential for prevention. On the one hand, epidemiological studies conducted worldwide have shown a relationship between the deficiency of several essential nutritional factors, including folate, and hearing loss. On the other hand, dietary intervention studies have demonstrated the existence of auditory protection and hearing loss attenuation in patients supplemented with folic acid, omega-3 polyunsaturated fatty acids or D-methionine.

This work shows a series of special characteristics of the methionine cycle in the mouse cochlea. This structure showed a gene expression and enzymes pattern of the methionine cycle specific of extrahepatic tissues with some particular characteristics that turn the cochlea into a singular tissue.

The results obtained for the first experimental model indicate that folic acid deficiency accelerates age-related hearing loss in the C57BL/6J mice, which is *per se* a model of premature hearing loss. This progressive deafness is accompanied by marked cell loss in the cochlea as well as the alteration of the normal expression pattern of mRNA and proteins of the methionine cycle, up to the point of causing local hyperhomocysteinemia and an increase in the oxidative stress.

In a second phase, the study of the nutritional deficiency of folic acid in a mice strain with normal auditory ageing, specifically the CBA/Ca mouse, is discussed. These animals showed a faster systemic deterioration when compared to the observed degree of hearing loss, which was still mild by 10 months, the most advanced age studied. The increased Hcy elimination through transsulfuration observed in the control group's cochleae was compensated by the omega-3 diet through increased BHMT remethylation in order to preserve the flux through the methionine cycle and the protein homocysteinylated levels within normality.

Finally, the study of the supplementation with omega-3 fatty acids in the diet showed a delay in the onset of age-related sensorineural hearing loss in the C57BL/6J model of premature hearing loss. On the contrary, ageing in the control mice was associated with an increased expression in the pro-inflammatory and a decrease in the anti-inflammatory cytokines at 10 months of age. Since this process has not been observed in animals supplemented with omega-3, these fatty acids appear to play an anti-inflammatory and neuroprotective role in the auditory ageing.

Altogether, the results obtained from the work presented here suggest that BHMT has a key role in the regulation of Hcy levels in the cochlea. Furthermore, these data propose that nutritional intervention for the control of homocysteine levels could be a new path to prevent hearing loss.

Keywords

Presbycusis, dietary restriction, hair cell loss, apoptosis, dietary supplementation, inflammation, oxidative stress, hyperhomocysteinemia, methionine cycle.

ABREVIATURAS

5'-Metil-THF	5'-metil tetrahidrofolato
3-NT	3-nitrotirosina
$\omega 3$	Omega-3 ¹
$\omega 6$	Omega-6 ²
A	
ABR	Auditory brainstem response (En castellano: potenciales evocados auditivos de tronco cerebral; PEATC).
Ada ³	Adenosina deaminasa
Adk	Adenosina quinasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico codificante
Ahcy	Adenosilhomocisteinasa o S-adenosilhomocisteína hidrolasa
ALA	Ácido α -linolénico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B	
B6	Vitamina B6
B12	Vitamina B12
BöC	Células de Böttcher
BC	Células basales de la estría vascular
Bhmt	Betaína homocisteína metiltransferasa
BM	Membrana basilar
C	
C57	Ratón de la estirpe C57BL/6J
Cat	Catalasa

¹ Abreviatura empleada para figuras exclusivamente.

² Ídem.

³ Las abreviaturas en minúsculas, cuando sea aplicable, se refieren al nombre del gen procedente del ratón, mientras que en mayúsculas (a lo largo del texto) se refieren a la proteína.

CBA	Ratón de la estipe CBA/Ca
Cbs	Cistationina β -sintasa
CC	Células de Claudius
CG	Ganglio coclear
Cth	Cistationina γ -liasa o cistationasa
D	
DAB	3,3 '-diaminobencidina
DC	Células de Deiter
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DHF	Dihidrofolato
DPOAE	Productos de Distorsión de Emisiones Otoacústicas
E	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
pErk	Quinasa regulada por señales extracelulares fosforilada
Erk	Quinasa regulada por señales extracelulares
F	
FAD ⁺	Dinucleótido de flavina-adenina, forma oxidada
FADH	Dinucleótido de flavina-adenina, forma reducida
Fox	Factores de transcripción de tipo <i>forkhead box</i>
Foxm1	Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box</i> M1
Foxp3	Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box</i> P3
G	
GAP43	Proteína de crecimiento asociado 43
Gclc	Glutamato-cisteína ligasa o γ -glutamylcisteína sintetasa, subunidad catalítica
Gclm	Glutamato-cisteína ligasa o γ -glutamylcisteína sintetasa, subunidad reguladora
Gnmt	Glicina-N-metiltransferasa
Gpx1	Glutación peroxidasa 1

Gpx4	Glutación peroxidasa 4
GSH	Glutación forma reducida
Gsr	Glutación reductasa
Gss	Glutación sintetasa
GSSG	Forma oxidada del glutación

H

H & E	Hematoxilina y eosina
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico
HC	Células de Hensen
Hcy	Homocisteína
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa del rábano

I

IdC	Células interdentadas
IC	Células intermedias o melanocitos de la estría vascular
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
Igf1r	Receptor de alta afinidad del IGF-I
IHC	Célula ciliada interna
IHF	Inmunohistoquímica
Il1 β	Interleukina 1 beta
Il6	Interleukina 6
Il10	Interleukina 10

J

Jnk	Quinasa nuclear c-Jun
-----	-----------------------

K

kDa	kiloDalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
Ki	Constante de disociación del inhibidor enzimático

L

LS	Limbo espiral
M	
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
Mat	Metionina adenosiltransferasa
Mat2a	Metionina adenosiltransferasa 2a
MC	Células marginales de la estría vascular
Mef2a	Factor potenciador 2A de miocitos
Mef2d	Factor potenciador 2D de miocitos
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
Mtr	Metionina sintasa
N	
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato, forma oxidada
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato, forma reducida
NOX	NADPH oxidasa
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
O	
OC	Órgano de Corti
OHC	Célula ciliada externa
OMS	Organización mundial de la salud
P	
p22phox (Cybapolipéptido)	Alfa citocromo, b-245
p38 (MAPK14)	Proteína quinasa activada por mitógenos 14
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Células pilares
Pemt	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
PFA	Paraformaldehído

PUFA	Ácidos grasos esenciales poliinsaturados
R	
RM	Membrana de Reissner
RPLP0	Proteína ribosomal grande P0
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa en tiempo real
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	S-adenosil-L-metionina
Sapk/Jnk	Proteínas quinasas activadas por estrés o quinasas nucleares Jun)
SM	Escala media o conducto coclear
Spl	Ligamento espiral
ST	Escala timpánica
StV	Estría vascular
SV	Escala vestibular
T	
tHcy	Homocisteína total en plasma
THF	Tetrahidrofolato
TM	Membrana tectoria
Tnfa	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	<i>Terminal <u>T</u>ransferase mediated <u>d</u>UTP-biotin <u>N</u>ick <u>E</u>nd <u>L</u>abelling</i>
W	
WB	<i>Western blotting</i>

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y fisiología del oído

El oído es el sistema encargado de la detección del sonido y el mantenimiento del equilibrio. Tradicionalmente se ha dividido en 3 partes: el oído externo, el oído medio y el oído interno (*Figura 1*).

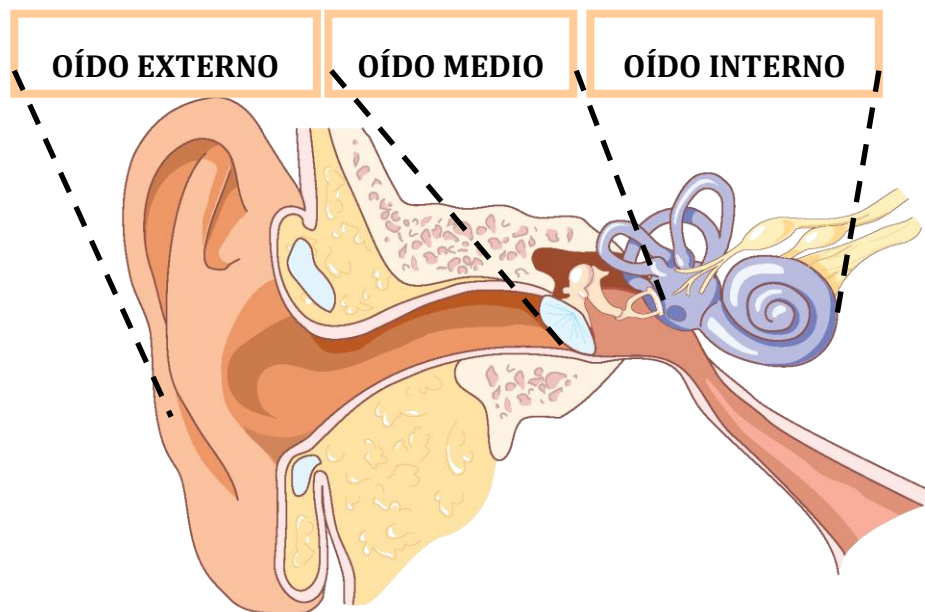


Figura 1. Anatomía del oído. El oído se divide en tres partes: i) el oído externo, formado por el pabellón auricular y el conducto auditivo externo, ii) el oído medio, albergado en la cavidad timpánica y compuesto por la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo), y iii) el oído interno, formado por el vestíbulo, los canales semicirculares y la cóclea. Adaptado de Karen Scott Audiology (<http://karenscoaudiology.com/hearing-loss>).

1.1. Oído externo

El oído externo se compone del pabellón auditivo externo, encargado de localizar la fuente sonora y amplificarla y del conducto auditivo externo, responsable de la transmisión de la onda sonora hacia el final del mismo, donde reside la membrana timpánica.

1.2. Oído medio

En el ratón, el oído medio se encuentra situado en el interior de la bulla o cavidad timpánica. Se separa del oído externo mediante la membrana timpánica, estructura fibrosa cuya porción más elevada posee una región carente de fibras de tejido conectivo denominada *pars flaccida* o membrana de Schrapnell. La porción restante de membrana timpánica, donde sí hay fibras de tejido conectivo, constituye la *pars tensa*. La membrana timpánica es la responsable de transformar las ondas sonoras en vibraciones mecánicas. Estas vibraciones son amplificadas por la cadena de huesecillos formada por: el martillo, unido a la membrana timpánica, el yunque, y el estribo, que transmite la vibración hacia la ventana oval de la cóclea (Schuknecht, 1993; Treuting & Dintzis, 2012; Rosowski, 2013). El martillo y el yunque del ratón se encuentran unidos por una sinartrosis cartilaginosa, considerándose esta como un “microtipo” de oído medio (Fleischer, 1978). Actualmente, se ha descrito que la especificidad frecuencial de las distintas especies depende directamente de la morfología y disposición de los huesecillos junto con las características de rotación de los mismos (Fleischer, 1978; Rosowski, 2013).

1.3. Oído interno

El oído interno es un órgano compuesto por un sistema cerrado de cavidades y conductos membranosos de paredes delgadas denominado el conducto membranoso. Esta compleja estructura se compone del laberinto vestibular y el conducto coclear. El laberinto vestibular constituye el órgano receptor para el sentido del equilibrio e incluye el utrículo, sáculo y los canales semicirculares. En él se encuentran las células sensoriales secundarias: células de la mácula del sáculo y el utrículo, y células de la cresta ampular en los conductos semicirculares. Situado en la pared del conducto coclear, se encuentra el órgano de Corti (OC), que es el órgano sensorial de la audición propiamente dicho y fue descrito en detalle en el año 1851 por Alfonso Corti. El laberinto membranoso, a su vez, se encuentra rodeado por el laberinto óseo o cápsula ósea, estructura que se encuentra excavada en la porción petrosa del hueso temporal. El laberinto óseo se compone de: el vestíbulo, que incluye utrículo y sáculo, los canales semicirculares, que contienen los conductos semicirculares, y la cóclea, donde reside el conducto coclear.

Tanto el interior del laberinto membranoso como el espacio entre este y el laberinto óseo, denominado espacio perilinfático, se encuentran rellenos de los líquidos que conocemos como las linfas (Merchan Cifuentes, 1983; Schuknecht, 1993; König *et al.*, 2007). Estas son:

- la *perilinf*a. Líquido rico en sodio (Na^+) y calcio (Ca^{++}) y pobre en potasio (K^+), cuya composición recuerda a la del medio extracelular, y se encuentra ubicada en el espacio perilinfático existente entre los laberintos óseo y membranoso y,
- la *endolinfa*. Líquido rico en potasio (K^+) y pobre en sodio y calcio (Na^+ y Ca^{++}). Dentro del laberinto membranoso, la endolinfa baña los conductos vestibular, semicirculares y coclear. Este líquido se mantiene con un elevado potencial de reposo de entre +80-100 mV, el cual es esencial para el funcionamiento normal de las células de estas estructuras.

Si se realiza un corte transversal por el eje mayor de la cóclea, se observa la existencia de un núcleo conectivo-neural en el centro, que no alcanza la porción más apical, denominado modiolo coclear. Alrededor del modiolo se disponen las tres cavidades en las que la lámina espiral ósea divide el canal coclear: la rampa o escala vestibular, la rampa o escala timpánica y el conducto coclear, también conocida como rampa o escala media. Las escalas vestibular y timpánica están tapizadas por células de origen mesodérmico y rellenas de perilinfa, mientras que la escala media conforma el laberinto membranoso de la cóclea, de origen ectodérmico, y se encuentra, por tanto, rellena de endolinfa. La escala vestibular se relaciona con la ventana oval mediante el vestíbulo y está separada de la escala media por la membrana de Reissner (RM) (*Figura 2*) (Merchan Cifuentes, 1983; Slepecky, 1996; König *et al.*, 2007; Treuting & Dintzis, 2012). La escala timpánica limita con la ventana redonda y se separa de la escala media mediante la membrana basilar. Las escalas timpánica y vestibular se comunican mediante el helicotrema en la región apical de la cóclea.

En la pared de la escala media podemos distinguir tres áreas diferenciadas: la pared vestibular, la pared lateral y la pared timpánica (König *et al.*, 2007).

La **pared vestibular** constituye la membrana de Reissner (RM), compuesta por dos estratos celulares que conforman una membrana avascular separando la escala media de la vestibular (*Figura 2*).

La **pared lateral** de la cóclea está formada por el *ligamento espiral* (Spl) y la *estría vascular* (StV). El ligamento espiral está compuesto en su mayor parte por tejido conectivo (fibrocitos tipo I a tipo V) y es la zona donde existe un mayor número de capilares para el abastecimiento y drenaje del oído. Esta estructura se extiende por encima y debajo de la StV y contacta con el extremo de los espacios pelinfáticos de las escalas vestibular y timpánica (*Figura 2*). Una de las funciones del Spl se relaciona con el mantenimiento del equilibrio iónico en la cóclea. Gracias a las uniones estrechas (tipo *gap*) y a las bombas NaK-ATPasa, se cree que esta estructura bombea el potasio hacia el exterior y lo transporta para mantener la alta concentración de este ión en la endolinfa (Spicer & Schulte, 1991). La *estría vascular* está formada por tres capas celulares: las células marginales (MC), las células basales (BC) y las intermedias (IC), los melanocitos (Raphael & Altschuler, 2003). La StV desempeña dos funciones principales: la generación del potencial endococlear y el mantenimiento y creación de una alta concentración de potasio en la endolinfa, que, de un modo complementario al Spl y gracias a la bomba NaK-ATPasa, facilita la expulsión de Na⁺ hacia el exterior de la endolinfa.

La **pared timpánica** se apoya sobre la lámina o membrana basilar, que se extiende desde el periostio de la lámina espiral ósea hasta el ligamento de la pared lateral.

El **órgano de Corti (OC)** descansa sobre la *membrana basilar* (BM) que constituye el suelo del conducto coclear y se extiende desde el ligamento espiral hasta la lámina espiral ósea. Entre los diferentes tipos celulares que constituyen el órgano de Corti están las células sensoriales, y las células de soporte, de tipo no sensorial. Encontramos dos tipos de *células ciliadas sensoriales*. Por un lado, las *células ciliadas internas* (IHC), que poseen forma de pera y llevan a cabo la transducción e inician la despolarización de las neuronas del ganglio coclear, siendo las encargadas de enviar los impulsos a través del nervio auditivo. Por otro lado, tenemos las *células ciliadas externas* (OHC), de forma cilíndrica, que son células sensoriales de soporte responsables del aumento de la sensibilidad y selectividad de la cóclea (Raphael &

Altschuler, 2003)(Figura 2). Las IHC se disponen a lo largo de la membrana basilar en una única fila de aproximadamente 700 células en el caso del ratón. Por su parte, las OHC se disponen en tres filas paralelas contando con aproximadamente 2500 células (Ehret & Frankenreiter, 1977). Todas las células ciliadas están conectadas a fibras nerviosas que pasan a través de los finos canales de la lámina espiral ósea (Ehret & Frankenreiter, 1977; Merchan Cifuentes, 1983; Möller, 2006). Cabe reseñar que la morfología de las células ciliadas y sus prolongaciones apicales ricas en actina o estereocilios, varían notablemente en función de la región en la que se observen. Así, las células ciliadas externas tienen una forma de W o U muy prominente y son más largas en la porción más apical de la cóclea con respecto a la región más basal, donde las células poseen una conformación más aplanada. Por su parte, los estereocilios de las células ciliadas internas tienen una morfología en forma de U y una gran longitud en el ápex que decrece gradualmente en torno a la base coclear (Raphael & Altschuler, 2003; Möller, 2006).

En el OC de los mamíferos no existen células basales (indiferenciadas) de modo que todas las células del epitelio sensorial están diferenciadas. Este inusual hecho en tejidos epiteliales hace que una vez que se pierden las células ciliadas, estas no puedan ser reemplazadas (Raphael & Altschuler, 2003). Por el contrario, las aves y los peces sí pueden regenerar dicho epitelio (Cruz *et al.*, 1987; Corwin & Cotanche, 1988).

Entre las células de soporte encontramos: las células pilares internas y externas (PC), que delimitan el túnel de Corti; las *células falángicas o de Deiters* internas y externas (DC), que son células neurogliales de soporte de las células ciliadas; las *células de Claudius* (CC) y las *células de Böttcher* (BöC), localizadas bajo las anteriores. Además se pueden encontrar las *células de Hensen* (HC), adyacentes a las de Deiters, formando el borde lateral del órgano de Corti (Krstic, 1991; Raphael & Altschuler, 2003). Las células ciliadas, junto con las de soporte, conforman la lámina reticular. Todas estas células recibieron su nombre entre los años 1851 y 1863 (revisado en Nomura, 2014)(Figura 2).

El órgano de Corti, consta además del *limbo espiral* (LS), con sus células interdentadas, (IdC) y de la *membrana tectoria* (TM). La TM se extiende a lo largo del órgano de Corti desde la región del limbo pegada a la pared vestibular (Figura 2). Se trata de un componente gelatinoso fabricado por las células de soporte con un elevado

contenido en agua (97%) y rico en colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Esta estructura se encuentra cubriendo la fila más alta de los estereocilios de las células ciliadas externas (Richardson *et al.*, 2008).

Existen tres tipos de fibras nerviosas inervando la cóclea: fibras nerviosas aferentes, fibras nerviosas eferentes (penacho olivococlear) y fibras nerviosas autónomas (adrenérgicas). Las fibras aferentes son células bipolares cuyos cuerpos se encuentran localizados en el *ganglio coclear* (CG; *Figura 2*), el cual se localiza en el canal de Rosenthal. Las fibras nerviosas pasan por la *habenula perforata* antes de continuar su camino hacia las células ciliadas. Se han descrito dos tipos de fibras aferentes, las de tipo I, mielinizadas (~95%), y las de tipo II, no mielinizadas (~5%). Las fibras nerviosas sinaptan con las células ciliadas internas de un modo diferente al de las externas. Así, la mayoría de las fibras nerviosas de tipo I contactan con una célula ciliada interna, mientras que las de tipo II se conectan con muchas células ciliadas externas. En el caso de las fibras de tipo eferente, son las OHC las que reciben la mayoría de estas fibras. La tercera fuente de inervación la forman fibras autónomas que aunque mayoritariamente inervan los vasos sanguíneos, también parecen contactar con las células ciliadas (Borg *et al.*, 1995; Möller, 2006).

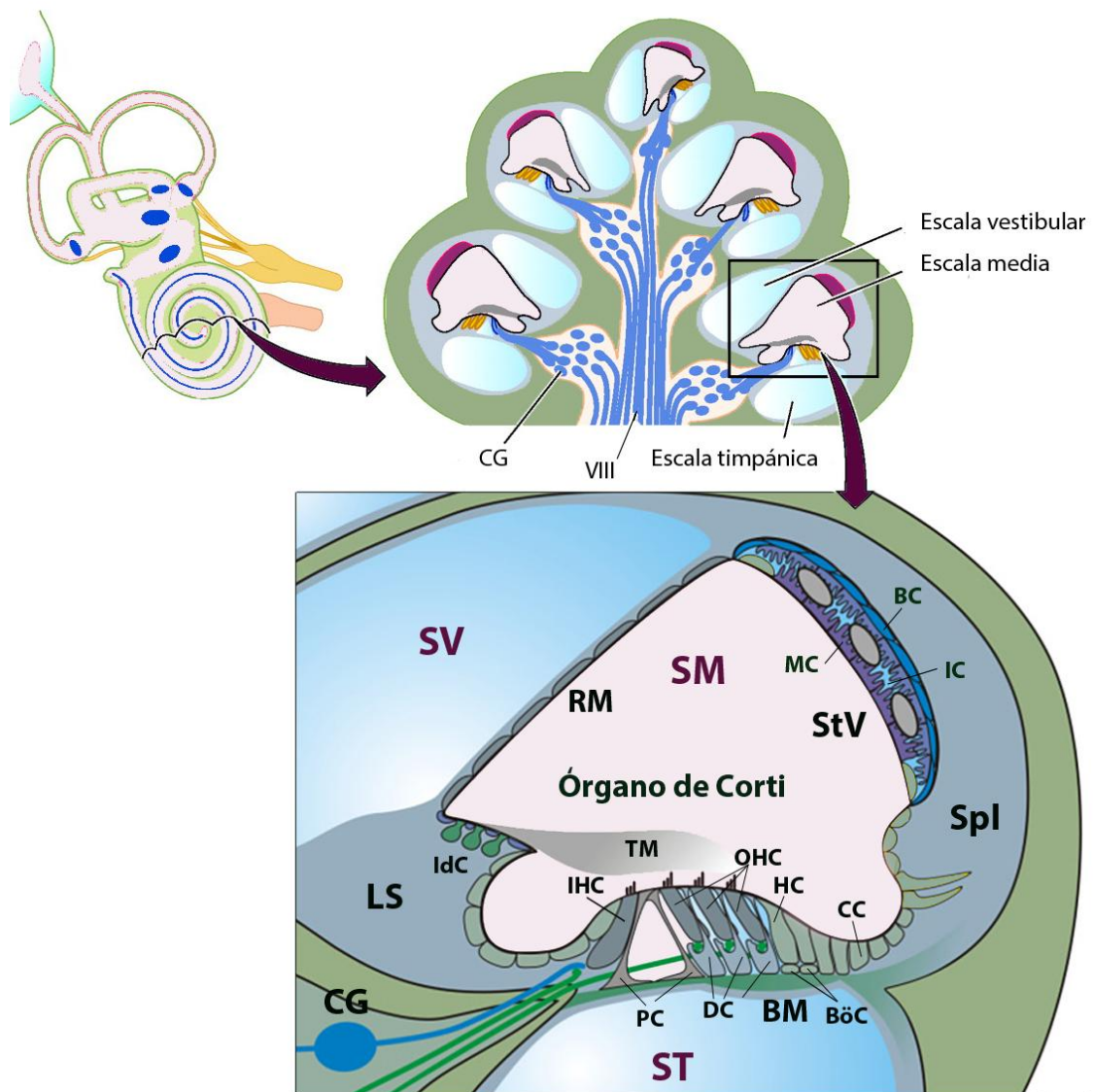


Figura 2. Esquema representativo de las estructuras que conforman la escala media o conducto coclear. Se muestra un dibujo del oído interno, seguido de un corte transversal a través del modiolus coclear del ratón y en más detalle, las estructuras presentes en la escala media. SV: escala vestibular; SM: escala media; ST: escala timpánica; TM: membrana tectoria; RM: membrana de Reissner; StV: estría vascular; MC: células marginales; IC: células intermedias; BC: células basales; IHC: células ciliadas internas; OHC: células ciliadas externas; DC: células de Deiter; HC: células de Hensen; BÖC: células de Böttcher; CC: células de Claudius; PC: células pilares; BM: membrana basilar; CG: ganglio coclear; LS: limbo espiral; Spl: ligamento espiral. Adaptado de Zdebik , 2009 (Zdebik *et al.*, 2009).

2. Mecanismo de transmisión del sonido

El sonido es captado y amplificado inicialmente por el pabellón auditivo externo y conducido a través del conducto auditivo externo hasta la membrana timpánica. Allí, los cambios de presión producidos en la pared externa de la membrana timpánica provocan la vibración de la misma, transmitiéndose dicha vibración a la cadena de huesecillos. El martillo, el yunque y el estribo se articulan conformando un sistema de palancas. Mediante este sistema, el estribo contacta directamente con la ventana oval de la cóclea, de tal forma que los huesecillos actúan como un mecanismo para transformar las vibraciones del aire en vibraciones de un líquido (perilinf). Debido a la imposibilidad de compresión de los líquidos dentro de las escalas vestibular y timpánica (principio de Pascal), el movimiento oscilatorio desde la ventana oval debe transmitirse a la ventana redonda a fin de mantener las estructuras inalteradas. Además, dado que la membrana de Reissner es muy fina, el movimiento del líquido en la rampa vestibular provoca también la oscilación de la membrana basilar del conducto coclear. Por tanto, es en el órgano de Corti donde se lleva a cabo el proceso de *transducción mecanoeléctrica o conversión de la señal mecánica en electroquímica*. La vibración de la membrana basilar moviliza la membrana tectoria y el órgano de Corti, produciendo así un desplazamiento relativo entre ambas estructuras. Este movimiento provoca la flexión de los estereocilios de las células ciliadas, lo cual desencadena una despolarización que activa los canales de calcio. A continuación, se genera un estímulo químico en la base de las células ciliadas liberándose un mediador químico en la sinapsis con la primera neurona aferente, transformándose así la energía mecánica en electroquímica. La señal se transmitirá inicialmente hacia las neuronas del ganglio coclear, cuyos axones conforman el nervio auditivo (VIII), desde donde se dirigirá hacia el núcleo coclear, el complejo olivar superior, el lemnisco lateral y el colículo inferior. Desde el colículo la señal se enviará finalmente hacia la corteza auditiva (Raphael & Altschuler, 2003; LeMasurier & Gillespie, 2005; König *et al.*, 2007; Moore, 2008).

La cóclea es capaz de separar los sonidos espectralmente en función de la frecuencia de modo que estos activen poblaciones concretas de fibras nerviosas auditivas a lo largo del conducto coclear. De esta manera, la base de la cóclea es la región donde se produce la transducción de las frecuencias altas, mientras que en el ápex, extremo opuesto de este conducto, se produce la transducción de las frecuencias

bajas (Raphael & Altschuler, 2003; Ohlemiller & Gagnon, 2007). Este proceso se conoce como tonotopía y se proyecta a lo largo de toda la vía auditiva (Willott *et al.*, 1993; Talavage *et al.*, 2004) (Figura 3).

Además de captar el sonido, la cóclea puede emitirlo. De este modo, el sonido se transmite en sentido opuesto a través del oído medio, generando una serie de sonidos que pueden registrarse con la ayuda de un micrófono específico colocado en el canal auditivo. Se trata de las emisiones otoacústicas, cuya detección se explica más detalladamente en la sección de material y métodos (Parham *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2006).

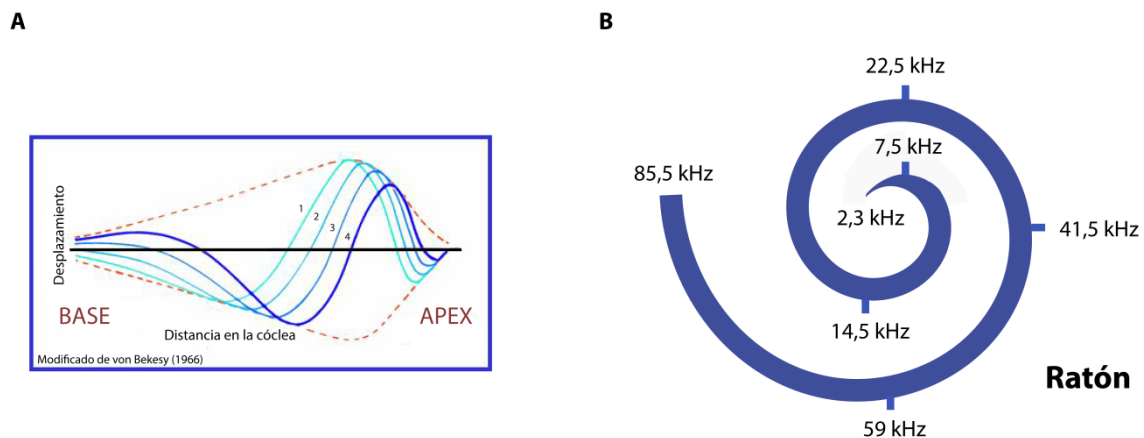


Figura 3. A. Esquema ilustrativo del movimiento de la onda viajera a lo largo de la membrana basilar. B. Esquema representativo de la disposición de las regiones de transducción de las frecuencias auditivas en el ratón. Adaptado de Müller, 2005 y Ou, 2000 (Ou *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2005).

3. Pérdida auditiva

3.1. Definición de sordera

De acuerdo con la Real Academia Española, la sordera se define como la privación parcial (hipoacusia) o total (cofosis) de la facultad de oír. El grado de pérdida se determina a través del *umbral auditivo*, el cual se establece en función del estímulo menos intenso que el individuo es capaz de percibir (Gelfand & Gelfand, 2004). La sordera puede clasificarse según: la severidad (leve, moderada, severa o grave), la topografía de la lesión (conductiva, neurosensorial, central o mixta), o la edad de

aparición (pre o post-lingual)⁴, pudiendo darse esta en uno o en ambos oídos (*Figura 4*). Teniendo en cuenta la severidad, y dada la gran variabilidad existente en las clasificaciones empleadas en los estudios de sordera, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido los umbrales auditivos específicos para cada categoría, aunque el uso de los mismos no está totalmente instaurado (Roth *et al.*, 2011). Esta categorización estipula que la pérdida auditiva es discapacitante cuando esta supera los 40 dB en adultos, en el oído que posee la mejor audición.

3.2. Prevalencia y consecuencias de la sordera

De acuerdo con los datos publicados recientemente por la OMS (OMS; Nota informativa N°300; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/es/>), alrededor de 360 millones de personas en el mundo padecen sordera de moderada a profunda. La incidencia de la sordera varía en función del sector poblacional. Así, mientras que en el sector infantil afecta aproximadamente a un 10% de la población, este porcentaje aumenta hasta el 30% en la población adulta con más de 65 años, y, lo que es más importante, esta incidencia crece exponencialmente con la edad (Roth *et al.*, 2011; Li-Korotky, 2012).

La pérdida auditiva conlleva una serie de consecuencias tanto a nivel funcional (limitación en la capacidad de comunicación) como a nivel social y emocional (aislamiento y riesgo de exclusión), o económico (mayor dificultad para encontrar empleo). El tratamiento de estos trastornos representa un grave problema socioeconómico en la mayor parte de las poblaciones envejecidas, como las de los países occidentales, donde la demanda global de tratamientos terapéuticos ha aumentado dramáticamente con la industrialización y la esperanza de vida. Además, dada la inversión de la pirámide poblacional por el envejecimiento de la misma, la

⁴En medicina humana. En medicina veterinaria (habitualmente en perros y gatos) se habla de sordera: (1) congénita o de aparición tardía, (2) hereditaria o adquirida, y (3) conductiva o neurosensorial. El diagnóstico de la sordera se llevará a cabo tras la apertura del conducto auditivo externo y deberá establecerse mediante la respuesta a estímulos sonoros no detectables mediante otros sentidos o mediante técnicas electrofisiológicas más sofisticadas como el ABR (Strain, 1996; 1999; Sataloff & Sataloff, 2005).

sordera, especialmente asociada al envejecimiento, está adquiriendo cada vez mayor prevalencia.

3.3. Etiología de la sordera: presbiacusia

La pérdida auditiva puede deberse a factores ambientales, genéticos o a una combinación de ambos. Aproximadamente un 50% de los casos de sordera neurosensorial se deben a causas genéticas (sindrómicas o no sindrómicas) mientras que el 50% restante se puede achacar a factores ambientales y/o de etiología aún desconocida (*Figura 4*). Aunque existen muchas enfermedades auditivas, la sordera más común es la neurosensorial, donde se observa una pérdida de las células ciliadas y de las neuronas primarias del oído interno. Dentro de las sorderas de tipo neurosensorial, se encuentran las relacionadas con los factores ambientales, tales como el ruido y los ototóxicos, que constituyen los estresantes inductores de sordera prematura mejor conocidos (Tabuchi *et al.*, 2011; Sliwinska-Kowalska & Davis, 2012).

En 1974, Schuknecht clasificó la pérdida auditiva asociada al envejecimiento o *presbiacusia* humana en cuatro tipos principales: sensorial, neural, metabólica (atrofia de la estría) y mecánica (Schuknecht, 1976). Aunque inicialmente, los estudios apuntaban a que la sensorial era la más frecuente, dos décadas después, Schuknecht y Gacek fueron conscientes de la dificultad de que estos sucesos se produjesen de manera aislada y modificaron ligeramente esta clasificación, considerando la presbiacusia como una sordera con un origen multifactorial, viéndose involucrados tanto factores genéticos como ambientales, lo cual le confiere un tremendo impacto en la calidad de vida de la población anciana (Dror & Avraham, 2009; Li-Korotky, 2012). A diferencia de la sordera congénita, se conocen muy pocos detalles sobre los factores genéticos que contribuyen a la presbiacusia, derivándose la mayor parte de esta información de los estudios llevados a cabo en modelos animales (Ohlemiller, 2006; Liu & Yan, 2007).

En la presbiacusia, la pérdida de audición suele producirse paulatinamente desde las frecuencias altas a las bajas, comenzando la degeneración anatómico-funcional desde la base hasta el ápex de la cóclea, teniendo su progresión una gran variabilidad individual (Gates & Cooper, 1991).

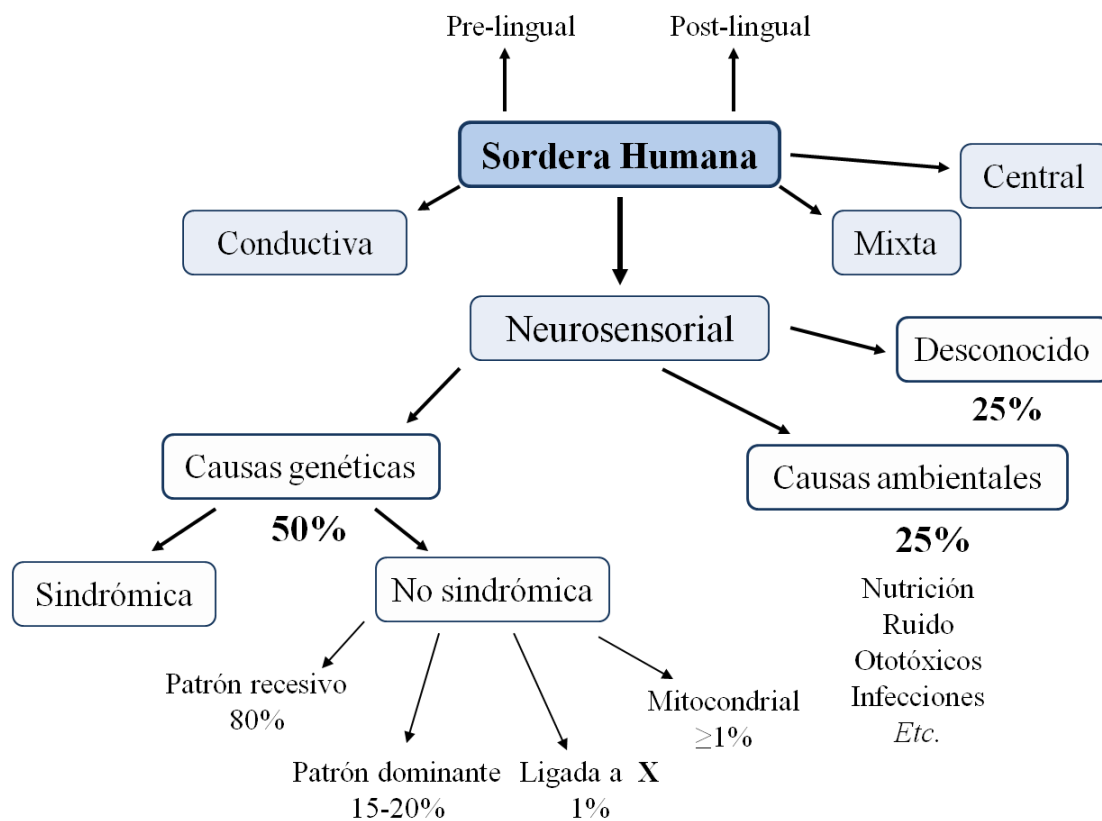


Figura 4. Clasificación de la sordera. Confeccionado a partir de Acmg, 2002 (Acmg, 2002).

4. El ácido fólico: historia y estructura química

En el año 1931, Lucy Wills mostró cómo una sustancia extraída de las levaduras era efectiva en el tratamiento de la anemia macrocítica tropical que solía aparecer al final de la gestación en mujeres de la India (Wills, 1931). En este momento se descubrió la posible existencia de una vitamina del grupo B sin identificar a la que se le dieron varios nombres: vitamina M, vitamina Bc o factor “U”. En el año 1941 se detectó un factor de crecimiento para el microorganismo *Lactobacillus casei* (y posteriormente para *Streptococcus faecalis R*) en las hojas de las espinacas, que poco tiempo después fue designado por sus autores con el nombre de “ácido fólico” (lat. *folium* = hoja) (Mitchell *et al.*, 1941). Fue en 1943 cuando el grupo de E. L. Robert Stokstad consiguió aislar la molécula a su forma pura (cristalina) a partir de levaduras y del hígado (Stokstad, 1943). La síntesis del ácido fólico se llevó a cabo por primera vez en 1945 y su estructura química fue descrita en 1946 (Angier *et al.*, 1945; 1946). La

vitamina Bc y el ácido fólico resultaron ser el mismo compuesto (Mitchell *et al.*, 1941). Estos estudios demostraron que el ácido fólico estaba compuesto por un anillo de pteridina, ácido paraminobenzoico y ácido glutámico. Por esta razón, también se denomina ácido pteroilglutámico (*Figura 5*)(Angier *et al.*, 1946). Años después, el ácido fólico fue descrito también en otros vegetales (Thomson, 1947; Santini *et al.*, 1964).

El término “*ácido fólico*” se emplea actualmente para denominar el compuesto químico completamente oxidado, sintético, no presente en alimentos naturales. Por su parte, el término “*folato*” se emplea para hablar de todos los compuestos con la misma actividad vitamínica, refiriéndose así tanto a los folatos naturales (poliglutamatos) como al ácido fólico (revisado en Hoffbrand & Weir, 2001; Tamura & Picciano, 2006). Los términos vitamina B9 y folacina también son sinónimos de ácido fólico.

Los folatos se encuentran en abundancia en muchos alimentos, tales como los vegetales de hoja verde y algunas frutas. También son ricos en folatos los huevos, las legumbres, los mariscos, la carne de cerdo y las aves de corral. Asimismo, se hallan en el hígado y en el riñón (Varela-Moreiras & Alonso-Aperte, 1999; Lucock, 2000); <http://www.pulevasalud.com/>). El folato aparece en los alimentos de forma natural en la forma reducida o tetrahydrofolato, con cadenas laterales compuestas por 2 a 10 residuos de glutamato unidos a un γ -péptido (*Figura 5*). Los folatos biológicamente activos se derivan de su reducción a dihidro- (DHF) y tetrahydrofolato (THF), seguidos por la adición de una unidad de carbono en las posiciones N-5 o N-10, o ambas, que les permite participar en el metabolismo de grupos de un carbono (Shane 2009). Esta unidad de carbono puede ser: metil (CH₃), metilen (-CH₂-), metenil (-CH=), formil (-CH=O) o formimino (-CH=NH) (*Figura 5*). En el apartado siguiente se explica la importancia del metabolismo de grupos de un carbono en mayor detalle.

La principal diferencia entre el folato y el ácido fólico radica en el grado de biodisponibilidad, esto es, la parte del total ingerido que se absorbe en el intestino y puede emplearse en procesos metabólicos. En la forma natural, el folato posee poca estabilidad durante el almacenamiento y procesado de los alimentos (Pentieva *et al.*, 2004). Por el contrario, el ácido fólico es más estable, por lo que es el que se utiliza para la suplementación nutricional (O'Broin *et al.*, 1975; Winkels *et al.*, 2007).

Muy poco tiempo tras su síntesis, se vio que el ácido fólico resultaba efectivo en el tratamiento de las anemias megaloblásticas de todos los tipos, siendo particularmente útil en aquellas relacionadas con gestación o malnutrición (Davidson & Girdwood, 1947).

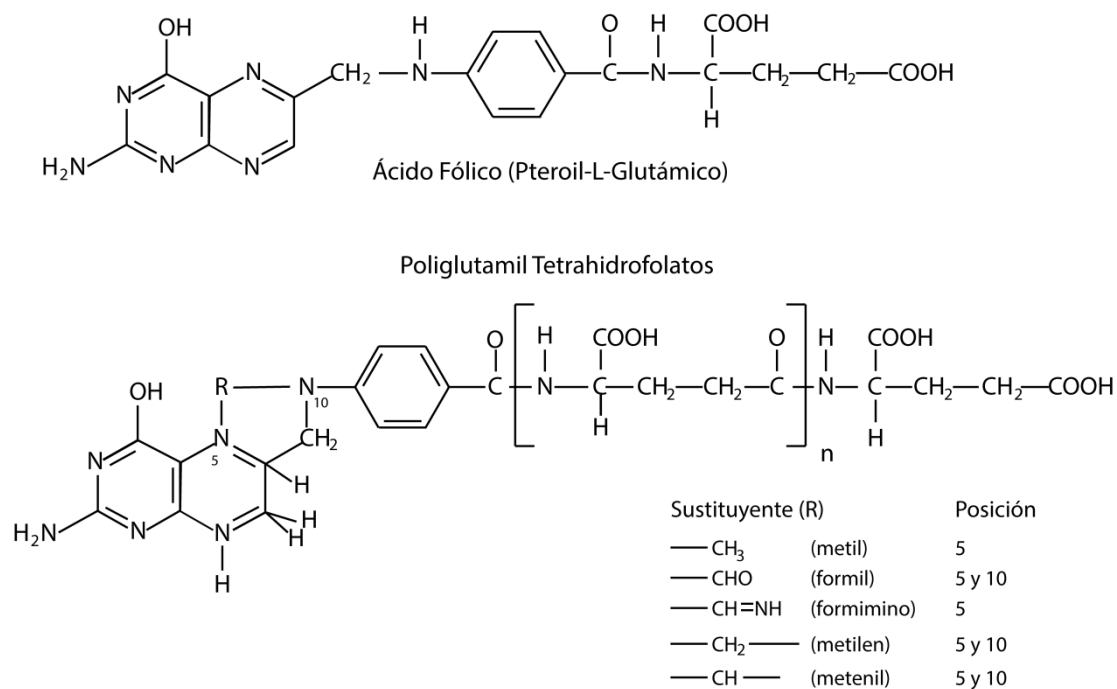


Figura 5. Estructura química del ácido fólico y sus derivados. Molécula de ácido paraminobenzoico unida a un anillo de pteridina en un extremo y a una molécula de ácido glutámico en el otro. Los folatos presentes en los alimentos poseen de 2 a 10 residuos de glutamato unidos al glutamato inicial. Adaptado de Present knowledge in nutrition (revisado en Erdman *et al.*, 2012).

4.1. Ciclo de los folatos

Debido a que el ser humano no es capaz de sintetizar el folato, ha de ingerirlo como parte de su dieta habitual (Hoffbrand *et al.*, 1971; Lucock, 2000). Los mamíferos poseen una serie de microorganismos intestinales capaces de sintetizar y absorber pequeñas cantidades de folato en el intestino delgado, aunque esta no es suficiente para prevenir una anemia en caso de un déficit nutricional en folatos. Su síntesis y absorción

se ha probado en estudios con roedores, y, aunque no está totalmente claro, la microbiota presente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos también parece poseer dicha capacidad (Klipstein & Lipton, 1970; Camilo *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2011; Spinler *et al.*, 2014).

Dado que la mayor parte de los folatos ingeridos en la dieta se encuentran en forma de poliglutamatos, se debe producir la hidrólisis de los mismos a monoglutamatos para que puedan ser absorbidos en el intestino. Esta ruptura y absorción se producen gracias a la enzima glutamato carboxipeptidasa II o folato hidrolasa que es activa en rata y otros roedores a un pH de 7,5 (Horne *et al.*, 1981; revisado en Erdman *et al.*, 2012), produciéndose la absorción principalmente en la región proximal del intestino delgado (Hepner *et al.*, 1968; Lucock, 2000). Una vez absorbido, la enzima DHF reductasa transforma el DHF y THF en tetrahidrofolato monoglutamato (como 5'-MTHF), atravesando la membrana plasmática y liberándose a la circulación sanguínea desde donde se dirigirá a los diferentes tejidos (Whitehead & Cooper, 1967; Melikian *et al.*, 1971; Tamura & Picciano, 2006). Una vez absorbido, el folato es transportado al hígado. La captación del MTHF en el entorno celular está mediada por cuatro sistemas diferentes: el transportador de folato unido a un protón (PCFT; expresado ampliamente en riñón, hígado y cerebro)(Shayeghi *et al.*, 2005; Yuasa *et al.*, 2009), un transportador de folato reducido de baja afinidad y alta capacidad (RFC) (Herbert & Das, 1993), y por dos receptores de folato de alta afinidad que actúan como mediadores en la captación de folato en el sistema nervioso (FR en humanos y FBP en roedores) (Rothberg *et al.*, 1990; Antony, 1992). El folato intracelular, en el caso del hígado, puede volver a transformarse en monoglutamato para regresar a la circulación sanguínea (revisado en Erdman *et al.*, 2012). A este respecto, los hepatocitos son las células que más folato almacenan (Horne *et al.*, 1978).

El folato que permanece en el interior celular va a tener un papel metabólico como donante y receptor de unidades de carbono. La transferencia de estas unidades de carbono durante el ciclo de los folatos, es esencial en muchos procesos entre los que se encuentran la síntesis de purinas y pirimidinas para la formación de ácidos nucleicos, las reacciones de metilación, el metabolismo de los aminoácidos y la síntesis de mielina o de neurotransmisores (Canellos *et al.*, 1967; Stover, 2004; Watkins *et al.*, 2009; Ross, 2010). De esta manera, durante el paso de 5'-MTHF nuevamente a THF, el aminoácido

homocisteína (Hcy) recibe un grupo metilo (-CH₃) de la desmetilación de MTHF y consecuentemente se remetila para generar metionina. Esta reacción se conoce como remetilación (Zeisel, 2009) y forma parte del ciclo de los folatos sirviendo de conexión con el ciclo de la metionina (*Figura 6*).

4.2. Folato y Homocisteína

El nodo metabólico de unión entre los ciclos de metionina y folato, y la vía de transulfuración, es la Hcy (*Figura 6*). Una de las formas de eliminación del aminoácido azufrado Hcy es mediante la *remetilación* a metionina. Esta reacción es catalizada por la metionina sintasa dependiente de cobalamina (MTR) o por la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT), enzimas que emplean el 5'-MTHF y la betaína, respectivamente, como donantes de grupos metilo (Finkelstein & Martin, 1984; Pajares & Perez-Sala, 2006). La BHMT es una tiometiltransferasa dependiente de Zn²⁺. Se han descrito dos isoenzimas diferentes codificadas por genes distintos, la BHMT y la BHMT2. La función de la BHMT2 hasta la fecha se desconoce (Chadwick *et al.*, 2000; Pajares & Perez-Sala, 2006). Por su parte, en la reacción de la MTR, un grupo metilo es transferido secuencialmente desde el 5'-MTHF a la cobalamina y posteriormente a la Hcy, formando la metionina. La metionina generada en ambas reacciones de remetilación se emplea para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), principal donante de grupos metilo para reacciones de transmetilación, incluidas la metilación del ADN, ARN, histonas, neurotransmisores y fosfolípidos (Mudd *et al.*, 2007). Los consumidores principales de SAM en hígado incluyen la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT), la guanidinoacetato metiltransferasa y la glicina N-metiltransferasa (GNMT), encargadas de sintetizar fosfatidilcolina, creatina y sarcosina, respectivamente (Mudd *et al.*, 2007). La donación del grupo metilo da como resultado la S-adenosilhomocisteína (SAH), que es hidrolizada por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (AHCY) en Hcy y adenosina. Se trata de una reacción reversible que favorece termodinámicamente la síntesis de SAH, que es un potente inhibidor de las reacciones de metilación (Finkelstein, 1998; Melnyk *et al.*, 2000). El control de los niveles de SAH depende de la eliminación de sus productos. Así, la adenosina es metabolizada por la adenosina deaminasa (ADA) y la adenosina quinasa (ADK), cuyas K_m favorecen su eliminación en cualquier condición. Además, se debe tener en cuenta que su expresión varía en función del tejido (revisado en Park & Gupta, 2013). El funcionamiento

correcto de la vía depende, por tanto, del aporte constante de 5'-MTHF que se recicla en el ciclo de los folatos.

La eliminación de Hcy se lleva a cabo por la *vía de transulfuración* y por su *eliminación en plasma*. La vía catabólica de transulfuración incluye dos reacciones que dependen de vitamina B6, las catalizadas por la cistationina β -sintasa (CBS) y la cistationasa o cistationina γ -liasa (CTH), y mediante las que se sintetizan cistationina y cisteína, respectivamente. Esta vía proporciona cisteína para la síntesis de proteínas y glutatión (GSH), siempre que el suministro de metionina a la célula sea suficiente y haya escasez de cisteína en la dieta (Pajares & Perez-Sala, 2006; Bailey, 2009; Zeisel, 2009).

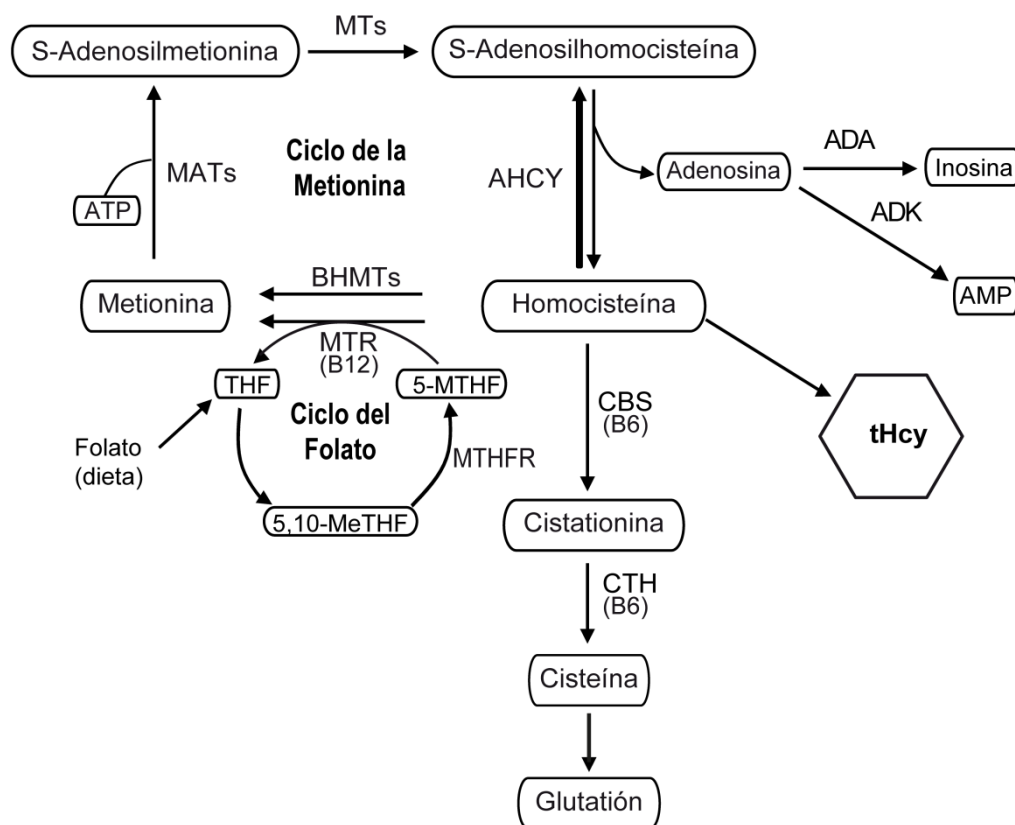


Figura 6. Relación del ciclo de los folatos con el ciclo de la metionina. Los metabolitos aparecen en cuadros blancos: THF: tetrahidrofolato; 5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato; 5,10-MeTHF: 5,10-metilentetrahidrofolato. Las enzimas incluyen: adenosina deaminasa (ADA); adenosina quinasa (ADK); S-Adenosilhomocisteína hidrolasa (AHCY); betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT); Metiltransferasas dependientes de SAM (MTs); metionina adenosiltransferasas (MATs); cistationina β -sintasa (CBS); cistationina γ -liasa (CTH); Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y metionina sintasa (MTR).

4.3. Deficiencia en folato

La deficiencia en folato es un problema dietético aún bastante común en las sociedades occidentales. El papel del ácido fólico durante el desarrollo fetal ha sido estudiado extensamente desde la década de los 60 tanto en el hombre (Hibbard, 1964; Smithells *et al.*, 1976; Blom *et al.*, 2006; Zeisel, 2009) como en el ratón (Craciunescu *et al.*, 2004). No obstante, no fue hasta finales de los años 80 cuando se comenzó a sospechar que el déficit en ácido fólico y vitamina B12, junto con niveles elevados de Hcy en sangre, podían estar relacionados con procesos neurodegenerativos tales como la demencia o el Alzheimer, hecho que ha sido confirmado posteriormente en numerosos estudios (Vatassery & Maletta, 1983; Clarke *et al.*, 1998; Miller, 2000; Dauncey, 2014).

El diagnóstico de la deficiencia en folato se basa principalmente en el estudio de: la historia clínica y el estado físico general del paciente (en roedores es más difícil), la sangre periférica, la médula ósea y los niveles en sangre de folato y otros metabolitos (Aslinia *et al.*, 2006; Watkins *et al.*, 2009). En este punto cabe destacar la dependencia que posee la MTR tanto de folato como de cobalamina, la cual explica por qué la deficiencia de cualquiera de estas dos vitaminas causa cambios similares en la médula ósea (Watkins *et al.*, 2009). El desarrollo de la anemia es lento, por lo que los síntomas pueden tardar en mostrarse, en función de la deficiencia, en torno a un mes o más tanto en personas como en roedores (Herbert, 1967; 1968; MacGregor *et al.*, 1990; Bills *et al.*, 1992). Una vez que aparece dicha anemia, los síntomas presentes en el hombre incluyen, entre otros, la pérdida de apetito, la fatiga y la pérdida de peso (Antony, 2011).

La ausencia de ácido fólico (o de vitamina B12) en el organismo provoca un déficit en la síntesis de ADN de las células precursoras de los glóbulos rojos, produciendo un descenso en su número y un aumento de su tamaño, definiéndose esto como una anemia macrocítica (Cox *et al.*, 1961; Herbert, 1967; Bailey & Caudill, 2012; Campbell, 2012). Esta anemia, además, es de tipo megaloblástica (médula ósea), pues los precursores de la serie roja, incluidos los megacariocitos, son más grandes de lo normal, es decir, poseen un citoplasma mayor en proporción al tamaño del núcleo. Precisamente, este tipo de anemia se caracteriza también por la presencia de neutrófilos hipersegmentados, poiquilocitosis y anisocitosis (Bills *et al.*, 1992; Everds, 2006)

Los hallazgos hematológicos de la deficiencia en ácido fólico se acompañan generalmente de niveles bajos de folato en suero y eritrocitos. Conjuntamente, la Hcy en plasma se encuentra aumentada en la mayoría de los pacientes (Cox *et al.*, 1961; Everds, 2006).

5. Ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6: historia

A principios del siglo XX la grasa se consideraba como una mera fuente de calorías totalmente intercambiable con los hidratos de carbono. Algunos años después, Burr y Evans mostraron que la alimentación con una dieta libre de grasas en animales, llevaba a problemas reproductivos y del crecimiento, lo que les condujo a pensar que la grasa poseía una sustancia esencial a la que denominaron vitamina F. Consecuentemente, en los años 1929 y 1930, la pareja de científicos Burr y Burr publicó dos artículos en los que mostraron que al eliminar el ácido linoleico aparecían signos de enfermedad, siendo, por tanto no la vitamina F sino el ácido graso *per se*, la molécula esencial. Ellos fueron los primeros en acuñar el término “ácidos grasos esenciales” (Burr & Burr, 1929; Burr & Burr, 1930; revisado en Holman, 1998). En el mismo artículo de 1930 observaron que la deficiencia en ácido linoleico no se corregía con ácido α -linolénico y viceversa. Por consiguiente, se habían descubierto dos familias de ácidos grasos esenciales (omega-3 y omega-6)⁵. A finales de los años 70 surgieron los primeros estudios que mostraban una conexión entre los omega-3 y las enfermedades cardiovasculares. Un epidemiólogo danés observó que la población esquimal residente en Groenlandia tenía una baja tasa de infarto cardiaco, mientras que aquellos esquimales que habían emigrado a Dinamarca tenían, sin embargo, los mismos problemas que los daneses. Este investigador señaló que la causa de ese hecho eran los ácidos grasos omega-3 procedentes del pescado, ya que la población ingería grandes cantidades de estos ácidos grasos de cadena larga (Kromann & Green, 1980; Bjerregaard & Dyerberg, 1988b; a). Con respecto a la esperanza de vida, se obtuvieron resultados similares en estudios realizados en las islas de Creta o Japón (Blackburn, 1986; Hirai *et al.*, 1989).

En 1982, los investigadores suecos Bergstrom y Samuelsson, y el británico Vane, obtuvieron el premio Nobel por encontrar la explicación a la unión entre la

⁵ El prefijo “lin” se debe a que ambos ácidos grasos se obtuvieron de semillas de lino.

deficiencia en ácidos grasos esenciales y los síntomas de la misma. Estos investigadores mostraron el papel de los eicosanoides en el organismo, cuyos precursores son los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6.

Algún tiempo más tarde, en los años 90 se comprobó que suplementar la dieta con omega-3 en pacientes con riesgo de fallo cardíaco resultaba positivo (Marchioli, 1999).

5.1. Ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6: estructura química

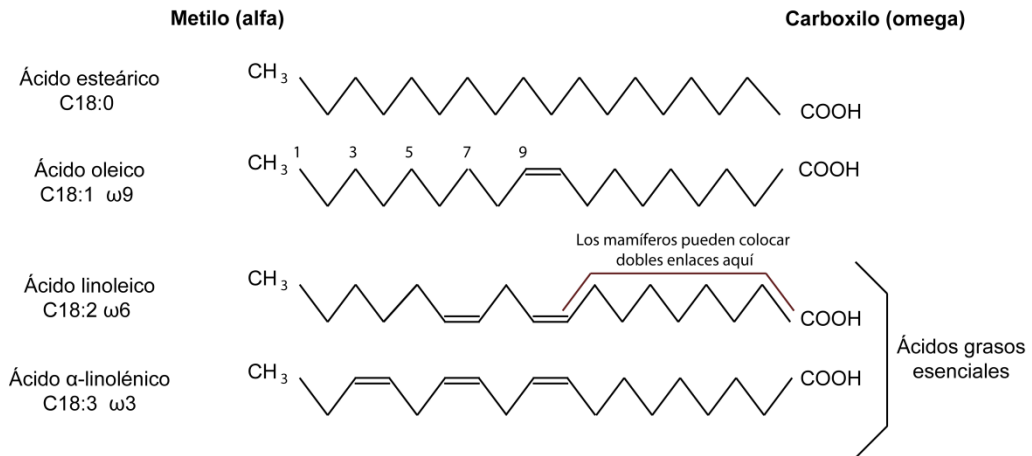
Los ácidos grasos son los componentes más abundantes de los lípidos, y se han definido como cualquier ácido monocarboxílico alifático que pueda ser liberado por hidrólisis de las grasas naturales (Fennema, 2000). La mayoría de las grasas y aceites de origen alimentario se componen en un 95% en peso de triacilglicéridos (3 ácidos grasos y una molécula de glicerol). El 5% restante está formado por mono y diacilglicéridos, esteroides, vitaminas liposolubles, etc. (Ziller, 1996). Los ácidos grasos forman parte de los lípidos que conforman las membranas lipídicas, y los ácidos grasos ingeridos en la dieta determinan la composición de las mismas.

Los ácidos grasos se clasifican según la longitud de su cadena, el grado de saturación (número de dobles enlaces) y por la posición y localización de los dobles enlaces en la cadena. De estas cualidades, junto con la isomerización (*cis* o *trans*) dependerán sus características físico-químicas y sus propiedades nutricionales.

En cuanto a su estructura química, todos los ácidos grasos poseen dos extremos, el grupo carboxilo (-COOH), que se considera como el comienzo (alfa), y el grupo metilo (CH₃), considerado como la cola o final (omega). Los ácidos grasos pueden ser saturados (CH₃-(CH₂)_n-COOH), sin dobles enlaces, o insaturados, los cuáles se caracterizan por la presencia de al menos un doble enlace de carbono (C=C). Existen diversos sistemas de clasificación para todos los ácidos grasos, incluida la sistemática, (Rigaudy & Klesney, 1979), aunque frecuentemente se emplea una nomenclatura simplificada en la que se tienen en cuenta el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la localización del primer doble enlace contando desde el extremo omega (Holman, 1964; Calder, 2013). Atendiendo a la localización del primer doble enlace desde el extremo omega, los ácidos grasos se clasifican

principalmente en: omega-3, omega-6 y omega-9. Se denominan así porque tienen localizado este doble enlace entre el tercer y cuarto carbonos, entre el sexto y el séptimo o entre el noveno y el décimo, respectivamente (*Figura 7A*).

A



B

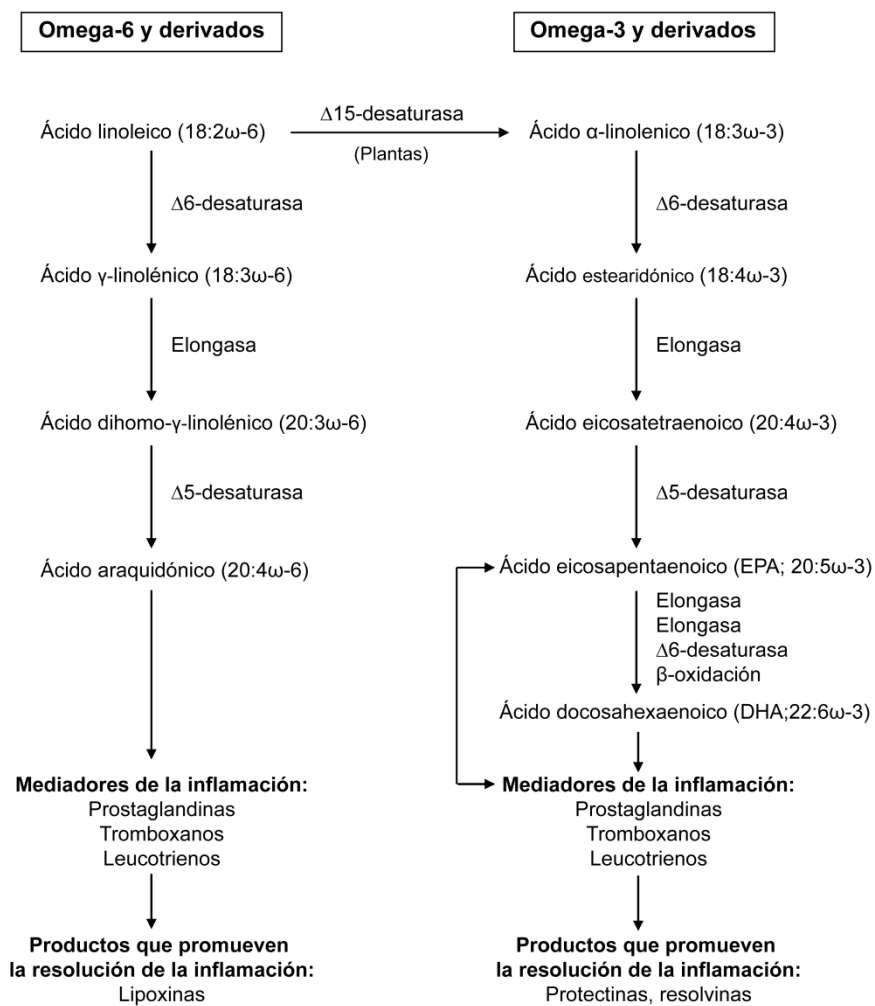


Figura 7. A. Estructura química de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados (omega-9) y poliinsaturados (omega-6 y omega-3). Adaptado de OMS y FAO (FAO, 1995). **B. Metabolismo de los ácidos grasos omega-3 y omega-6.** DHA, ácido docohexaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico. Adaptado de Calder y Mehta (Calder, 2013; Mehta *et al.*, 2009).

Los omega-3 y omega-6 son ácidos grasos esenciales poliinsaturados (PUFAs) precursores de ácidos grasos de cadena larga (16 ó más átomos de carbono). Los PUFAs, a su vez, poseen funciones energéticas y estructurales en las membranas celulares, y controlan el metabolismo de los eicosanoides, que intervienen en procesos tan importantes como la inflamación o la señalización celular (Fennema, 2000; revisado en Erdman *et al.*, 2012).

El ácido graso omega-3 más sencillo es el alfa-linolénico (18:3 ω 3), que se sintetiza a partir del omega-6 ácido linoleico (18:2 ω 6) por desaturación gracias a la enzima Δ 15-desaturasa presente en las plantas. Dado que los mamíferos no son capaces de llevar a cabo esta reacción, ambos ácidos deben ingerirse con la dieta. Sin embargo, sí pueden sintetizar el resto de ácidos grasos omega-3 y omega-6 (además del resto de insaturados) mediante reacciones de elongación y desaturación (Calder, 2013) (*Figura 7B*).

Existen tres tipos de ácidos grasos omega-3 implicados en la fisiología humana: el ácido α -linolénico o ALA (aceite vegetal), el ácido eicosapentaenoico o EPA y el ácido docosahexaenoico o DHA (aceites de origen animal). Las algas o el fitoplancton marinos, así como las nueces o el aceite de cáñamo son fuentes primarias de ALA. Los aceites de pescado, de huevo o de calamar son las fuentes de EPA y DHA de origen animal. Ambas fuentes de ácidos grasos se consideran esenciales. Aunque teóricamente a partir del linolénico por reacciones de elongación y desaturación se puede obtener EPA y DHA, la realidad es que dicha síntesis es bastante pobre en el hombre y rara vez llega hasta la conversión a DHA, por lo que se suele recurrir a fuentes naturales de las mismas o suplementos (Arterburn *et al.*, 2006; Calder, 2013) (*Figura 7B*).

Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 compiten por los mismos lugares de reconocimiento de las enzimas involucradas en su metabolismo (de Antueno *et al.*, 2001). Dado que los omega-6 se consumen en torno a 20 veces más que los omega-3, se

ha establecido que la relación adecuada entre ambos para un correcto funcionamiento del organismo es de entre 5:1 y 10:1 (WHO, 1994; Simopoulos, 2008).

5.2. Metabolismo de los ácidos grasos

La digestión exógena de los lípidos es un proceso complejo que ocurre a lo largo del tracto gastrointestinal (*Figura 8*). Las lipasas lingual (Lohse *et al.*, 1997) y gástrica a la llegada del bolo alimenticio al estómago (Canaan *et al.*, 1999a) actúan provocando la hidrólisis de aproximadamente entre el 10 y el 30% de las grasas (Mu & Hoy, 2004). Una vez el bolo pasa al intestino delgado la actividad de estas enzimas baja debido al pH existente. El intestino delgado es el lugar dónde se producirá la mayor parte de la digestión de los triglicéridos, en co-dependencia con la lipasa pancreática y las sales biliares (Mu & Hoy, 2004). La llegada de las grasas al duodeno desencadena la liberación de la bilis (sales biliares, fosfolípidos y colesterol) que se encarga de emulsionar el contenido intestinal o quimo (Canaan *et al.*, 1999b). Además de la secreción de las sales biliares, la grasa estimula la liberación de colecistoquinina y la lipasa pancreática al duodeno. Esta última enzima es la responsable de la digestión de los triglicéridos, en sus posiciones sn-1 y sn-3, en el intestino (Canaan *et al.*, 1999a; Canaan *et al.*, 1999b; revisado en Erdman *et al.*, 2012). Los fosfolípidos y colesterol se absorben directamente si están libres, o se hidrolizan, respectivamente, por la fosfolipasa A₂ o la lipasa pancreática (colesterol éster hidrolasa)(revisado en Erdman *et al.*, 2012).

El destino de los triacilglicéridos generados dependerá de su tamaño y número de saturaciones. Así, si los ácidos grasos son de cadena media o corta (≤ 10), serán transportados directamente por la circulación portal al hígado unidos a albúmina, penetrarán en las células por difusión pasiva y se reesterificarán en su interior, previo paso por la β -oxidación, formando parte de los fosfolípidos o los eicosanoides, bien como depósito de energía, bien formando parte del colesterol (White *et al.*, 1999; revisado en Erdman *et al.*, 2012). El resto de ácidos grasos serán transportados vía linfática en forma de lipoproteínas (quilomicrones), que son complejos macromoleculares formados por un núcleo apolar (triglicéridos y colesterol) y una capa externa más hidrosoluble formada por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre (Babin & Gibbons, 2009). Las lipoproteínas de transporte generadas en el intestino tras la digestión de la grasa se denominan quilomicrones y su función principal es la del

transporte de las grasas desde el intestino a otros tejidos. Una vez en la circulación, los triacilgliceroles que conforman los quilomicrones son hidrolizados para liberar ácidos grasos que se almacenarán en los tejidos o participarán en el metabolismo y procesos de oxidación. Los quilomicrones a los que se les ha eliminado el triacilglicerol son transportados al hígado unidos a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o a análogos (Cooper, 1997). Los componentes de estas lipoproteínas son empleados por el hígado o incorporados a nuevas lipoproteínas. El transporte por las lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) y las LDL pertenece a la ruta endógena del metabolismo de los lípidos. De este modo, los ésteres de colesterol serán transportados por las VLDL a los tejidos por los capilares donde la lipasa lipoproteica degradará las VLDL a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), las cuáles volverán al hígado o se transformarán en LDL (FAO, 1995; revisado en Erdman *et al.*, 2012).

La oxidación de los ácidos grasos sucede en la mitocondria. Allí, el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos permite emplear los triglicéridos almacenados cuando son requeridos en lo que se denomina la *β -oxidación*. Se trata de un proceso catabólico en el que los ácidos grasos se activan a través de la unión con la coenzima A, atraviesan la mitocondria y a partir de ese momento sufren la degradación cíclica de dos átomos de carbono mediante una secuencia de reacciones repetidas de cuatro pasos: oxidación con FAD^+ (deshidrogenación), hidratación, oxidación con NAD^+ (deshidrogenación) y tiólisis. Estos pasos se repiten hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas de acetyl CoA que pueden ingresar en el ciclo de Krebs, y las coenzimas reducidas $NADH$ y $FADH_2$ sirven como donantes de electrones en la cadena respiratoria (revisado en Erdman *et al.*, 2012).

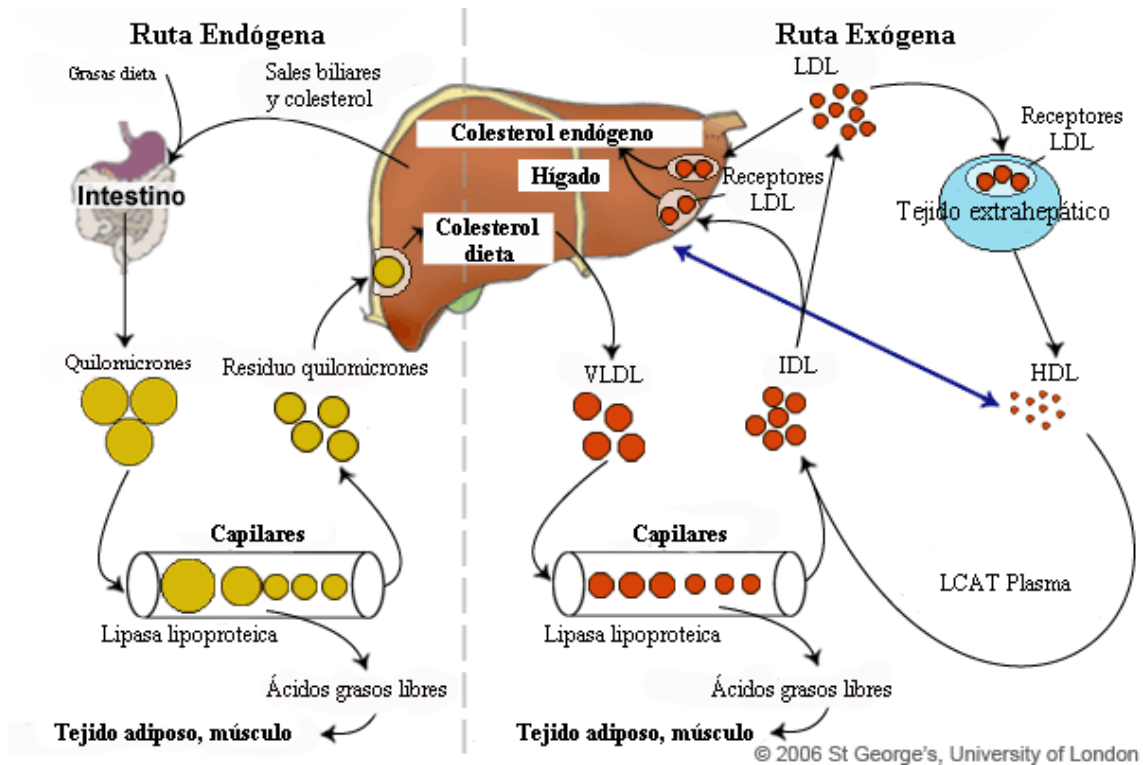


Figura 8. Esquema simplificado de la digestión de los lípidos ingeridos con la dieta. Ruta exógena: las grasas de la dieta son digeridas en un 10-30% por las lipasas lingual y gástrica, y una vez en intestino (duodeno), son digeridas por la lipasa pancreática y las sales biliares. Las grasas de cadena larga se transforman en quilomicrones, van a la sangre, de ahí a tejidos y el residuo de los quilomicrones vuelve al hígado para ser reutilizado. El hígado provee las sales biliares para la digestión de las grasas. Ruta endógena: las grasas son transportadas a los tejidos extra-hepáticos por las diferentes lipoproteínas (LDL, VLDL), la lipasa lipoproteica degrada las VLDL a IDL y este vuelve al hígado o se transforma en LDL, que transportará el colesterol, principalmente. Las HDL se liberan en el torrente sanguíneo y se encargan de recoger el colesterol para llevarlo de vuelta al hígado. Adaptado de un esquema publicado por la Universidad de St. George en Londres.

5.3. Ácidos grasos e inflamación

Las membranas celulares se componen de una bicapa de fosfolípidos. Se trata de estructuras dinámicas, puesto que sus componentes son responsables no solo de incorporar nutrientes y de eliminar los productos tóxicos presentes en la célula, sino también de mantener una comunicación constante con el entorno mediante el uso de mensajeros moleculares. Estos mensajes son captados en la superficie de la membrana por proteínas receptoras, que entran en contacto con otras proteínas en la superficie interna de la célula, que, en muchos casos, son enzimas que catalizan la transformación

química de los fosfolípidos que componen la membrana. Un ejemplo de esto es la fosfolipasa A₂. Esta enzima elimina un ácido graso, normalmente un PUFA, de la parte intermedia de un fosfolípido y este ácido graso será posteriormente transformado en sustancias bioactivas (Lodish & Matsudaira, 2000; revisado en Lawrence, 2010) (*Figura 7B*).

Las células regulan la fluidez de sus membranas mediante el control de la incorporación de ácidos grasos durante la síntesis de los fosfolípidos que las componen, y también con el cambio del contenido de dichos fosfolípidos y la cantidad de colesterol. Es importante recordar que la célula regula los niveles de colesterol en respuesta a la disponibilidad de PUFAs con respecto a los monoinsaturados o saturados. Por esto, una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados reduce los niveles de colesterol en sangre, y viceversa. Además, se ha descrito que los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 reducen los niveles de colesterol en sangre porque se unen más fuertemente que los omega-6 a los elementos reguladores que controlan la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis del colesterol (Schmitz & Ecker, 2008).

Dado que uno de los PUFA más comunes en las membranas es el omega-6 denominado ácido araquidónico, su transformación enzimática dará lugar a una gran cantidad de mensajeros. El uso del ácido araquidónico sigue dos rutas metabólicas principales, por un lado la ruta de la ciclooxigenasa (COX), que dará lugar a la producción de prostaglandinas y tromboxanos, y por otro, la ruta de la lipoxigenasa que llevará a la formación de leucotrienos, canabinoides y leucoxinas. Todas estas sustancias producidas a partir de ácidos grasos de 20 carbonos o más, se conocen con el nombre de eicosanoides (Fletcher, 1993). Los tromboxanos (TXA₂) producidos a partir del araquidónico tienen efectos vasoconstrictores y favorecen la coagulación, mientras que las prostaglandinas (PGI₂) tienen el efecto contrario. Por su parte, los derivados del metabolismo por la vía de las lipoxigenasas constituyen principalmente sustancias pro-alérgicas y pro-inflamatorias, salvo las lipoxinas, que poseen efecto anti-inflamatorio (A₄) (Serhan *et al.*, 1984). Al contrario de lo que podría parecer, los eicosanoides no son sustancias perjudiciales para la célula, sino que poseen muchos efectos sobre el organismo en función del ácido graso originario. Son los responsables de la contracción y relajación uterinas, del aumento y disminución de la presión sanguínea, del aumento o supresión de la respuesta inmune frente a la inflamación, etc.

Al igual que sucede con el araquidónico, los PUFAs omega-3, como el EPA, también pueden ser transformados en eicosanoides activos compitiendo con el ácido araquidónico para conseguirlo. Esta transformación genera la conversión de EPA a tromboxano A₃ (TXA₃) y prostaglandina I₃ (PGI₃) en lugar de TXA₂ y PGI₂ (Vance & Vance, 2002; revisado en Lawrence, 2010). El mero hecho de que el EPA tenga un doble enlace más que el araquidónico hace que la agregación plaquetaria y vasoconstricción producidas por el TXA₃ sean mucho más débiles que las producidas por el TXA₂ y que la PGI₃ sea tan efectiva como la PGI₂ en el bloqueo de la agregación y vasoconstricción. Esto implica que una mayor concentración de EPA en las membranas celulares con respecto al araquidónico aumentará el tiempo de coagulación de la sangre (Lands, 1992).

Estudios recientes sugieren la existencia de varias dianas moleculares responsables de los efectos de los ácidos grasos omega-3, en concreto los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) y el receptor acoplado a proteínas G 120 (GPR120). A esto hay que añadir los derivados de EPA y DHA, como las resolvinas, los docosatrienos y las neuroprotectinas, que parecen estar involucrados en la regulación del sistema inmune y en la protección del tejido nervioso frente al estrés oxidativo causado por la inflamación (Serhan *et al.*, 2000; Serhan *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2004).

El receptor PPAR γ actúa como biosensor de los ácidos grasos y tiene un papel clave en su metabolismo y homeostasis. Además, la activación de este receptor inhibe la respuesta inflamatoria mediante el bloqueo en la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)(Morales *et al.*, 2006). Se ha descrito la activación de este receptor con concentraciones elevadas de omega-3 (Krey *et al.*, 1997), pero también parece existir una ruta independiente de PPAR γ (Draper *et al.*, 2011). Por este motivo, son necesarios más estudios para determinar el papel real de PPAR γ en la actividad anti-inflamatoria que poseen los ácidos grasos omega-3.

Con respecto a las resolvinas, se han descrito dos familias: las de la serie E (procedente del EPA) y las de la serie D (procedente del DHA), que junto con la ya conocida lipoxina A₄, producida a partir del ácido araquidónico, parecen situarse en primera línea en la mediación de los procesos inflamatorios (Serhan *et al.*, 2000; Serhan

et al., 2002; Serhan *et al.*, 2004; revisado en Im, 2012).. En ambas familias de resolvinas se han identificado, hasta la fecha, cuatro receptores acoplados a proteínas G como algunas de sus dianas de unión (revisado en Im, 2012)

Recientemente se han descrito 5 receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) cuyos ligandos han resultado ser los ácidos grasos libres [FFAR1 (GPR40), FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41), GPR84, y GPR120]. En concreto, se ha visto que el receptor GPR120 reconoce ácidos grasos de cadena larga y se ha detectado en macrófagos y adipocitos, entre otras células. Estudios realizados en un modelo animal de ratón mostraron que el tratamiento con una dieta rica en omega-3 en ratones obesos indujo un efecto antidiabético y de sensibilización sobre la insulina mediante la supresión de la inflamación tisular inducida por macrófagos, que no se produjo en el ratón mutante para el receptor GPR120 (Oh *et al.*, 2010). Sin embargo, dado que el omega-6 también es capaz de activar este receptor, cabe la posibilidad de que el GPR120 no sea el verdadero mediador del efecto anti-inflamatorio del omega-3. Algo que aún no se ha podido explicar es por qué los omega-3 tienen mayor poder anti-inflamatorio, dado que las resolvinas se obtienen tanto de los omega-3 como de los omega-6. Además, se ha descrito que las resolvinas E1 y D1 activan más eficazmente sus receptores GPCRs que los omega-3 al GPR120, de ahí que algunos autores señalen a estos intermediarios como los verdaderos responsables del efecto anti-inflamatorio de los ácidos grasos poliinsaturados (revisado en Im, 2012).

6. Nutrición, envejecimiento y sordera

El descenso en la funcionalidad del organismo como consecuencia del envejecimiento está asociado con la aparición de una variedad de enfermedades crónicas que incluyen el cáncer, la diabetes, la arterioesclerosis, la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares (Lopez-Otin *et al.*, 2013; DeCarlo *et al.*, 2014). Además, de manera concomitante al proceso de envejecimiento, se observa una discapacidad sensorial progresiva, siendo las medidas de las funciones visual y auditiva las propuestas para su uso como marcadores del descenso cognitivo (MacDonald *et al.*, 2004; Tay *et al.*, 2006; DeCarlo *et al.*, 2014). Se han realizado numerosos estudios, tanto epidemiológicos como en modelos animales, que relacionan la importancia de una

dieta adecuada no solo durante el desarrollo y el crecimiento (Church *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2010), sino también en el envejecimiento. Las consecuencias del cambio de dieta en adultos se han visto claramente en estudios llevados a cabo en poblaciones migratorias. Así, el riesgo de enfermedad cardiovascular aumentó en esquimales que modificaron su dieta al emigrar a zonas urbanas con respecto a aquellos que permanecieron en su lugar de origen (Kromann & Green, 1980; Bjerregaard & Dyerberg, 1988a). Otro ejemplo claro se corresponde con el incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad, que los emigrantes en Europa procedentes de países de bajo poder adquisitivo en el Sur de Asia (India, Pakistan, Bangladesh, Sri Lanka) han adquirido tras el aumento de la ingesta de grasa y energía en la dieta en detrimento de los carbohidratos y los vegetales (Holmboe-Ottesen & Wandel, 2012)

6.1. Folato, envejecimiento y sordera

Hace casi 50 años, ya se sospechaba que la nutrición podía tener un papel fundamental en el desarrollo de la pérdida auditiva. En relación con esto, algunos autores mostraron la relación entre las alteraciones cardiovasculares y la sordera (Rosen & Olin, 1965; Johnsson & Hawkins, 1972), a la par que otros relacionaron la arterioesclerosis en el oído interno con la sordera por envejecimiento (Makishima, 1978). Estos estudios mostraron que la causa subyacente para la atrofia de la estra vascular, región de la cóclea con una tasa metabólica muy elevada dada la necesidad de mantener el potencial endococlear (Wangemann, 2006), era la enfermedad microvascular (Schuknecht *et al.*, 1974; Makishima, 1978).

En el año 1999, un estudio longitudinal llevado a cabo en una población de mediana edad, mostró cómo la suplementación con ácido fólico producía un mejor mantenimiento de sus niveles en sangre y evitaba el incremento en los niveles de Hcy en plasma (Jacques *et al.*, 1999). Este artículo expuso la idea de que el ácido fólico y la Hcy deben estar en perfecto equilibrio para que el organismo funcione correctamente. Apoyando esta idea, se ha visto que algunos estudios de presbiacusia y sordera súbita han mostrado niveles bajos en la concentración sanguínea de ácido fólico (Houston *et al.*, 1999; Lasisi *et al.*, 2010), mientras que otros, han encontrado niveles aumentados de Hcy plasmática (Cadoni *et al.*, 2004). La relación directa entre el ácido fólico y la sordera ha sido descrita en dos estudios recientes. En el primer estudio, se observó una

relación entre la sordera inducida por ruido en trabajadores de una central hidroeléctrica y el aumento en los niveles de Hcy en sangre (Gok *et al.*, 2004). En el segundo estudio, se monitorizó el efecto de la suplementación dietética con folatos llevado a cabo en pacientes durante tres años. Este ensayo mostró cómo la suplementación con ácido fólico favoreció el retardo en la pérdida auditiva asociada al envejecimiento (Durga *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos estudios epidemiológicos también han analizado la presunta relación entre la mutación *MTHFR* C677T y la sordera, encontrando resultados contradictorios (Durga *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2011; Fusconi *et al.*, 2012).

Los modelos animales han generado una serie de datos, que tomados en conjunto, apoyan la idea de que el correcto funcionamiento del ciclo de la metionina tiene un papel central en la fisiopatología auditiva. Por ejemplo, los ratones mutantes para *Cbs*^{+/-}, mostraron umbrales auditivos aumentados, niveles elevados de Hcy en la estría vascular y el ligamento espiral, y una reducción de la densidad vascular e incremento del estrés oxidativo. Estos efectos fueron prevenidos mediante la administración de ácido fólico en el agua de bebida (Kundu *et al.*, 2012). También se ha descrito la presencia de pérdida auditiva, más concretamente cofosis, en los ratones nulos para la *Conexina 30* (*Cx30*^{-/-}). Estos animales mostraron la disminución y el aumento en la expresión de *Bhmt* y *Ahcy*, respectivamente, a la par que mostraron niveles elevados de inmunomarcaje de Hcy en la estría vascular (Cohen-Salmon *et al.*, 2007).

A grandes rasgos puede decirse que los estudios epidemiológicos y los datos genéticos obtenidos de los estudios con modelos animales, refuerzan la hipótesis de que la deficiencia en ácido fólico y el metabolismo de la metionina tienen un papel clave en los trastornos auditivos.

6.2. Omega-3, envejecimiento, inflamación y sordera

Existen muchos estudios que muestran cómo la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta está relacionada con enfermedades como el infarto (Dewailly *et al.*, 2001), la enfermedad inflamatoria intestinal (Calder, 2009), la artritis reumatoide (Hurst *et al.*, 2010), la diabetes (McEwen *et al.*, 2010) o el cáncer (Lichtenstein, 2003; Erkkila *et al.*, 2008). Una de las relaciones que parece estar más fuertemente unida a la ingesta cualitativa es la enfermedad coronaria (Tourolouki *et al.*, 2010; Kromhout, 2012;

revisado en Mori, 2014). Estudios recientes han mostrado que el consumo de omega-3, en concreto de EPA y DHA, reduce considerablemente el riesgo de enfermedad cardiovascular (Dewailly *et al.*, 2001; Erkkila *et al.*, 2008). En el sistema nervioso, los PUFAs omega-3 se encuentran en todas las células (membranas) y organelas, y su papel esencial en el mismo fue demostrado en un estudio en el año 1982 en el que se observó una neuropatía desencadenada por una deficiencia en omega-3 que fue corregida tras el cambio en la composición de la misma (Holman *et al.*, 1982)

Como se ha descrito en el apartado anterior, los niveles elevados de Hcy se consideran como un factor relacionado con la pérdida auditiva (Gok *et al.*, 2004; Durga *et al.*, 2007), además de como un factor independiente de riesgo de enfermedad cardiovascular (Ueland & Refsum, 1989). Por otra parte, las enfermedades cardiovasculares también están asociadas con la inflamación, una condición que se ha visto mejorada con la suplementación de ácidos grasos omega-3 (Calder, 2010; 2014). Al respecto, hasta la fecha, se han llevado a cabo algunos estudios sobre el efecto de la suplementación con omega-3 en la pérdida auditiva y el metabolismo de la metionina, obteniéndose resultados contradictorios con respecto a los efectos sobre la tHcy. Por un lado, la suplementación dietética con aceite de pescado durante 8 semanas (3gramos/día de omega-3) en adultos sanos mostró un incremento progresivo en los niveles de tHcy (Piolot *et al.*, 2003). Por otro lado, un meta-análisis que empleó los datos de once ensayos control/placebo concluyó que la tHcy se veía reducida con la suplementación con omega-3 (Huang *et al.*, 2011). En consenso con este meta-análisis, el estudio “*Blue Mountains Hearing Study*” y un seguimiento a lo largo de tres años de pacientes involucrados en el ensayo de ácido fólico y el grosor del complejo íntima-media de la carótida (FACIT), mostraron la existencia de una correlación inversa entre los niveles ingeridos de ácidos grasos omega-3 de cadena larga y la sordera (Dullemeijer *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2010). Adicionalmente, un único tratamiento de aféresis terapéutica con 3g/d de omega-3 en el estudio “*Italian multicenter study on low-density lipoprotein apheresis*” (IMSLDLA), fue suficiente para eliminar los síntomas de sordera súbita (Stefanutti *et al.*, 2013a).

También se han realizado estudios de suplementación o deficiencia en animales. Así, en un estudio llevado a cabo en crías de ratas alimentadas con exceso o deficiencia de ácidos grasos omega-3 durante la gestación y lactación, se observaron

signos de alteración en el registro de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral o ABR (Church *et al.*, 2009; Church *et al.*, 2010). Otros estudios demostraron que la suplementación con omega-3 llevaba al descenso en tHcy, y otros, sin embargo, no mostraron ningún cambio tras algunas semanas de suplementación, aunque cabe destacar que en estos animales no se llevó a cabo evaluación auditiva alguna (Kulkarni *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013).

Estos experimentos en modelos animales se realizaron en períodos limitados de tiempo, no mostrando, por tanto, si la suplementación en adultos de ácidos grasos omega-3 podría tener un efecto preventivo en la pérdida auditiva asociada al envejecimiento. La base de esta protección parece sustentarse, de nuevo, en la relación entre la enfermedad vascular y la pérdida auditiva, que fue inicialmente sugerida como respuesta ante la falta de sordera por envejecimiento y enfermedad cardiovascular en la tribu *Mabaan* y apoyado posteriormente por varios estudios de correlación entre episodios cardiovasculares y la sordera (Rosen & Olin, 1965; Johnsson & Hawkins, 1972; Makishima, 1978; Gates *et al.*, 1993; Fusconi *et al.*, 2012). Algunos modelos animales, como el jerbo, también mostraron una disminución en la cantidad de capilares en regiones concretas de la estría vascular entre los 5 y 9 meses de edad (Gratton & Schulte, 1995), y una disminución en el flujo sanguíneo de la pared lateral de la cóclea a los 2-3 años de edad (Prazma *et al.*, 1990).

Los dos primeros modelos experimentales de ratón descritos en este trabajo (secciones I y II) se centran en el estudio de dos modelos de deficiencia nutricional de folatos a los 4 y 10 meses de edad. Por un lado se empleó un modelo de pérdida auditiva normal, el ratón CBA/Ca, y por otro un modelo de pérdida auditiva prematura, el ratón C57BL/6J. Se realizó un seguimiento de la función auditiva junto con: análisis de metabolitos, estudio histológico, estudio de expresión de ARN y de proteínas y estudio del estrés oxidativo, con el fin de dilucidar algunos de los mecanismos por los cuales la función coclear se puede estar viendo afectada por esta condición. Para el tercer experimento de intervención nutricional estudiado en este trabajo (sección III), se empleó un modelo de pérdida auditiva prematura, el ratón C57BL/6J, y se llevó a cabo un estudio de suplementación dietética de dieta control u omega-3 realizando un seguimiento de la función auditiva durante ocho meses. Además de esto, se estudió el metabolismo de la metionina a nivel coclear y una serie de marcadores de estrés

oxidativo y de inflamación con el fin de conocer más a fondo el posible mecanismo involucrado en la prevención de la pérdida auditiva.

En conjunto, todos estos estudios y datos sugieren una disminución en el suministro de nutrientes a la cóclea como el origen de la sordera progresiva, que a su vez conduciría a deficiencias en las vías metabólicas clave que involucran tanto el ácido fólico como los ácidos grasos omega-3.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

El deterioro de la función auditiva como consecuencia del déficit nutricional, especialmente en el envejecimiento, ha adquirido una gran relevancia en los últimos años debido principalmente al incremento de la esperanza de vida y a la cada vez mayor alteración de los patrones de alimentación en la población en los países desarrollados.

Estudios epidemiológicos han sugerido la importancia del ácido fólico y los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6 en el mantenimiento de la función auditiva humana. Sin embargo, se desconoce el perfil enzimático del ciclo de la metionina en la cóclea, así como los mecanismos por los cuales alteraciones en la ingesta de estas moléculas podrían causar una pérdida auditiva.

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

1. Caracterización del metabolismo de la metionina en la cóclea.
2. Estudiar el impacto del déficit de ácido fólico sobre el sistema auditivo.
 - 2.1. Establecer si la disminución drástica de esta vitamina esencial acelera la aparición de la sordera en un modelo de envejecimiento auditivo prematuro.
 - 2.2. Estudiar las bases moleculares del efecto observado.
 - 2.3. Establecer si la ausencia de ácido fólico en un modelo de envejecimiento auditivo normal acelera la aparición de la pérdida auditiva.
3. Estudiar el impacto de la suplementación de los ácidos grasos esenciales omega-3 sobre el sistema auditivo.
 - 3.1. Establecer si los ácidos grasos omega-3 contribuyen al correcto funcionamiento del oído interno.
 - 3.2. Determinar las bases moleculares del efecto observado.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Todos los productos empleados han sido de calidad analítica. Se incluyen en el apartado de Métodos las casas comerciales de los más relevantes.

MÉTODOS

1. Animales

Todos los individuos se adquirieron con 7 semanas de edad de las casas comerciales Harlan Interfauna Ibérica S.A y Charles River. A su llegada, los animales se estabularon en la sala de cuarentena del animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”⁶ durante un período de aclimatación de 7 días hasta la realización de las pruebas auditivas. Tras este período, los animales fueron divididos de forma aleatoria en los diferentes grupos experimentales, en función del tipo de dieta recibida. Tanto la dieta como el agua fueron suministradas *ad libitum*. Además, en algunos experimentos se empleó el ratón nulo para *Bhmt*^{-/-} (Teng *et al.*, 2011) con fines comparativos. Los ratones *Bhmt*^{-/-} se retrocruzaron siempre con ratones C57BL/6J y se mantuvieron en las mismas condiciones que los del experimento para el que fueron empleados.

Todos los animales y procedimientos utilizados cumplieron con la directiva del Parlamento y el Consejo 2010/63/UE y con el Real Decreto 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. También cumplieron lo descrito en la Ley 6/2013 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Igualmente, todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

⁶ Los animales de la estirpe C57BL/6J tratados con la dieta deficiente en ácido fólico, se alojaron durante 8 semanas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid antes de llegar al Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” donde se llevaron a cabo las pruebas auditivas y la posterior toma de muestras.

2. Modelos y dietas

Para confeccionar los modelos animales, se emplearon dos estirpes de ratón que fueron seleccionadas en base a sus características auditivas (Li & Borg, 1991):

2.1 Modelo de envejecimiento auditivo normal

Se emplearon 21 ratonas de la estirpe CBA/Ca (CBA) de 7 semanas de edad.

a) Modelo de dieta deficiente: CBA

❖ Dieta comercial estándar de mantenimiento (A04/A04C/R04, Scientific Animal Food & Engineering, UK; Grupo control): con un contenido de 0,5 mg/kg de ácido fólico.

❖ Dieta comercial deficiente en folato (Grupo deficiente): Con niveles de ácido fólico $\leq 0,1-0,2$ mg/kg (Harlan Tecklad TD.95247).

2.2 Modelos de envejecimiento auditivo prematuro

Se utilizaron 149 ratonas de la estirpe C57BL/6J (C57) de 7 semanas de edad.

a) Modelo de dieta deficiente: C57

❖ Dieta comercial estándar de mantenimiento (Grupo control).

❖ Dieta comercial deficiente en folato (Grupo deficiente): Con niveles de ácido fólico $\leq 0,1-0,2$ mg/kg (Harlan Tecklad TD.95247).

b) Modelo de dieta suplementada: C57

En este caso, se decidió optar por la elaboración de dietas de tipo semisintético debido a la duración del experimento y a la gran susceptibilidad al enranciamiento oxidativo que sufren las dietas con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. La dieta control se fabricó con la misma composición con fines comparativos.

❖ Dieta básica (Grupo control): De fabricación propia con una proporción de 40 g aceite de soja/kg pienso.

❖ Dieta suplementada con omega-3 (Grupo omega-3): Dieta básica de fabricación propia con una proporción de 38,5 g aceite de soja y 1,8 g de aceite de pescado (Eupoly®-3 EPA, Biosearch S.A., Granada,

España) por cada kg pienso. La composición específica del aceite de pescado empleado se puede consultar en el Anexo 1.

Las mezclas mineral (TD.94049 PWD Mineral Mix, AIN-93M-MX) y vitamínica (TD.94047 PWD Vitamin Mix, AIN-93-VX) empleadas para la fabricación de las dietas fueron elaboradas por Harlan Tecklad. La composición en detalle de la dieta básica y de estas mezclas puede verse en las *Tablas 1-2*.

DIETA BÁSICA	
Componente	Peso (g)
Fécula de maíz	620,7
Caseína ($\geq 85\%$)	140,0
Celulosa	50,0
Sacarosa	100,0
Mezcla mineral	35,0
Mezcla vitamínica	10,0
L-cistina	2,5
Colina	2,5
Ter-butilhidroquinona	0,008
Aceite	
Grupo control	40,0 g aceite de soja
Grupo omega-3	38,4 g aceite de soja 1,6 g de aceite de pescado*

Tabla 1. Composición de la dieta básica y de las cantidades de aceite administradas a cada dieta para el modelo 2.2. *Ver Anexo 1 para la composición específica del aceite de pescado.

MEZCLA VITAMÍNICA		MEZCLA MINERAL	
Componente	Peso (g)	Componente	Peso (g)
Niacina	3	Carbonato calcico	357,0
Pantotenato de calcio	1,6	Fosfato potásico monobásico	250,0
Piridoxina-HCl	0,7	Sulfato potásico	46,6
Tiamina-HCl	0,6	Citrato tripotásico monohidratado	28,0
Riboflavina	0,6	Cloruro sódico	74
d-Biotina	0,02	Oxido de magnesio	24,3
Vitamina B ₁₂	2,5	Citrato férrico	6,06
Vitamina E, α -tocoferol	15,0	Carbonato de zinc	1,65
Vitamina A palmitato	0,8	Carbonato de manganeso	0,63
Vitamina D ₃ ,	0,2	Carbonato cúprico	0,31
Vitamina K,	0,0075	Ioduro potásico	0,01
Sacarosa	974,705	Selenato de sodio	0,0103
Ácido fólico	0,02	Paramolibdeno de amonio 4-hidratado	0,008
		Meta-silicato de sodio 9-hidratado	1,45
		Sulfato de cromo y potasio 12-hidratado	0,275
		Cloruro de litio	0,0174
		Ácido bórico	0,0815
		Fluoruro sódico	0,0635
		Carbonato de niquel	0,0318
		Vanadato de amonio	0,0066
		Sacarosa	209,496

Tabla 2. Composición de las mezclas mineral y vitamínica empleadas para la elaboración de las dietas del modelo 2.2 (Tecklad, Harlan).

Tanto las dietas comerciales como las de fabricación propia fueron elaboradas según los requerimientos nutricionales básicos estimados para los roedores por el Consejo Nacional de Investigación (National.Research.Council, 1995) y se basaron en dietas previamente utilizadas y validadas (Partearroyo *et al.*, 2010; Partearroyo *et al.*, 2013).

Se administraron cantidades frescas de todas las dietas con una frecuencia de 2 (formulaciones comerciales) a 3 veces por semana (formulaciones no comerciales). Las dietas se mantuvieron a -20°C para asegurar su frescura, descongelándose en frigorífico (4°C) la noche previa a su administración.

La cantidad media de dieta ingerida se calculó mediante la diferencia entre el pienso añadido y el pienso realmente consumido. Esta medición fue llevada a cabo de 2 a 3 veces por semana (en función del tipo de dieta) a lo largo de todo el experimento.

3. Procedimientos experimentales no invasivos

3.1 Control de peso

Semanalmente y a lo largo de todo el experimento, se realizó un registro del peso de todos los animales incluidos en el estudio empleando una balanza digital Boeco (BBL 53, Hamburgo, Alemania; rango 0,01-610 g).

3.2 Evaluación auditiva

Para llevar a cabo el estudio de la función auditiva, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina a 100 mg/kg (Imalgene®, Laboratorios Merial S.A., Barcelona, España) y xilacina a 10 mg/kg (Rompun®, Laboratorios Bayer, Barcelona, España) mediante inyección intraperitoneal. Tras observar la pérdida de los reflejos de estación y retirada, se les suministró vía tópica una pomada oftálmica (Lubrifilm, Alcon Cusí S.A, El Masnou, Barcelona, España), con el fin de evitar lesiones corneales y se colocaron sobre una manta de agua circulante a 37,5°C (Gaymar, TP500 y TP3E, Orchard Park, Nueva York, Estados Unidos) para mantener la homeotermia, dentro de una cámara acústica sonoamortiguada de fabricación propia para evitar interferencias externas (Cobo Parra *et al.*, 2012).

3.2.1 Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC; auditory brainstem response, ABR)

La técnica de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (ABR) constituye un método cuantitativo del registro de la actividad eléctrica generada por las estaciones de la vía nerviosa auditiva en respuesta a un estímulo sonoro. El registro

típico de ABR es una señal u onda formada por ondas (con sus correspondientes picos y valles) que representan la actividad sináptica de los núcleos consecutivos de las estaciones o estructuras anatómicas principales a lo largo de la vía en el tronco del encéfalo (*Figura 9*). En el ratón se han identificado 5 picos positivos (I-V) que se corresponden con: la cóclea y el nervio auditivo (I), el núcleo coclear (II), el complejo olivar superior (III), el lemnisco lateral (IV) y el colículo inferior (V) (Jewett & Williston, 1971). Cada una de estas ondas, se caracteriza por una amplitud (medida en unidades de voltio) y una latencia (tiempo que transcurre desde la generación del estímulo hasta la aparición de la onda, medido en milisegundos).

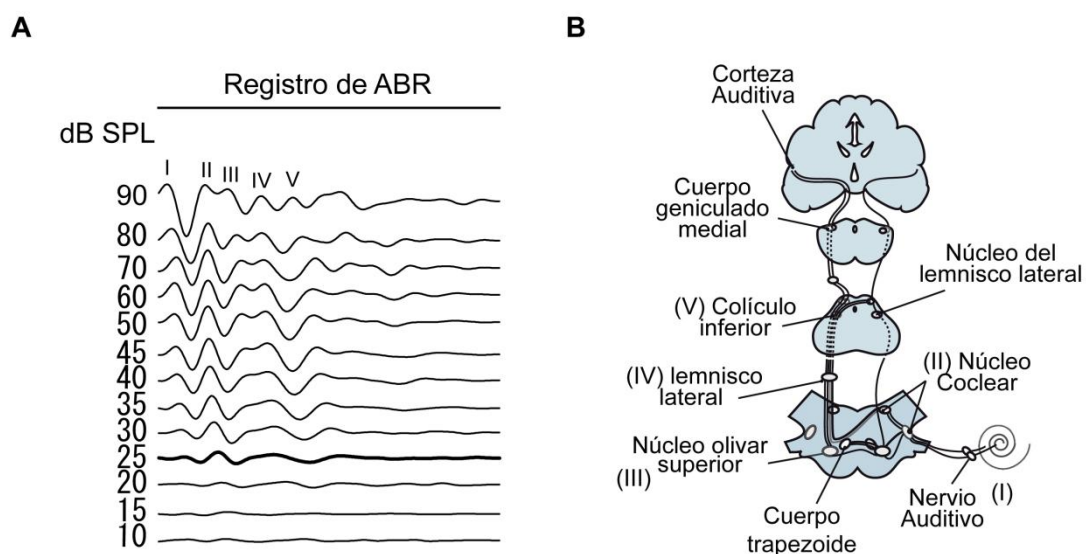


Figura 9. A. Ondas ABR en respuesta a click representativas de un ratón joven con normo-audición. B. Esquema de la vía auditiva adaptado de Murillo-Cuesta S. y cols., 2012 (Murillo-Cuesta *et al.*, 2012).

Para el registro de la actividad eléctrica se colocaron tres electrodos de aguja subcutáneamente (Acero inoxidable de 12 mm. de longitud y 0,3 mm. de diámetro). El electrodo activo se localizó en la zona del vértex, situada en la línea media entre los dos pabellones auriculares. El electrodo de referencia fue colocado bajo el pabellón auricular derecho y el electrodo de tierra se insertó en la zona lumbar del animal. Para llevar a cabo la estimulación, se emplearon sonidos tipo click (rango de frecuencias de 0 a 48 kHz) y tonos puros generados mediante el software SigGenRP™ (Tucker-Davis™

Technologies, Gainesville, FL, USA). Se calibraron los estímulos empleando el software SigCalRP™ (Tucker-Davis™ Technologies) y un micrófono ACO Pacifics de ¼ pulgada (ACO Pacific Inc., Belmont, California, Estados Unidos). La duración de los estímulos fue de 0,1 ms para los de tipo click y 5 ms para las distintas frecuencias de 4, 8, 16, 20, 28 y 40 kHz (estímulo tipo sinusoidal, 2,5 ms para cada tramo de incremento y descenso de frecuencias, sin meseta). Los estímulos sonoros fueron emitidos por altavoces magnéticos de campo múltiple (MF1, Tucker-Davis™ Technologies), colocados a una distancia fija de 5 cm del pabellón auditivo ipsilateral. La actividad eléctrica resultante de la estimulación auditiva fue amplificada mediante un preamplificador con cabezal de baja impedancia (RA4-PA/RA4-LI, Tucker-Davis™ Technologies) y posteriormente registrada. Para cada estímulo y frecuencia se obtuvo el promedio de las respuestas recogidas tras 1000 estímulos a diferentes intensidades, disminuyendo la intensidad del sonido desde 90 hasta 20 dB SPL (Sound pressure level), en pasos de 10 dB inicialmente y de 5 dB SPL a medida que nos acercamos al umbral. La discriminación de la actividad eléctrica auditiva frente a otra actividad eléctrica (cerebral, muscular, equipos) se consiguió mediante la estimulación repetida y la promediación de la respuesta sincronizada al estímulo. Todos los individuos se sometieron a la misma batería de test salvo que se especifique lo contrario. Los registros obtenidos se analizaron utilizando el programa BioSigRP™ (Tucker-Davis™ Technologies). Los umbrales auditivos se obtuvieron para cada estímulo según lo descrito en Zheng et al. (Zheng *et al.*, 1999). Se consideró el umbral auditivo como la menor intensidad de sonido capaz de generar una respuesta evocada reconocible y en la que el voltaje promedio de los picos superase al menos 2 veces la desviación estándar del promedio de la actividad eléctrica de fondo (Ngan & May, 2001; Cediél *et al.*, 2006).

Además de los umbrales auditivos, en este estudio se analizaron las latencias, latencias interpico (I-II, II-IV y I-IV) y amplitudes para el estímulo click a una intensidad de 15-20 dB SPL por encima del umbral auditivo.

3.2.2 Emisiones Otoacústicas (EOA) y Productos de distorsión de emisiones otoacústicas (PDEOA o DPOAE en inglés)

Las emisiones otoacústicas (OAE, en inglés) son sonidos de baja intensidad generados en la cóclea que se propagan en sentido inverso a través de la cadena de huesecillos y el tímpano, produciendo una señal acústica medible en el canal auditivo. Estos sonidos son generados específicamente por las células ciliadas externas del órgano de Corti. Existen EOA de tipo espontáneo, las cuales son inconstantes, y EOA provocadas como respuesta tras una estimulación auditiva adecuada con tonos puros (DPOAE). Estas últimas son las que se emplean con mayor frecuencia en diagnóstico clínico. La técnica de DPOAE se basa en la estimulación auditiva con dos tonos sonoros puros (f_1 y f_2) de características conocidas (frecuencia, intensidad, velocidad de estimulación, etc.) y posterior registro de la actividad generada por las células ciliadas externas mediante un micrófono y un procesador específicos. Las diferentes frecuencias empleadas fueron generadas mediante el programa SigGenRP™. El registro de los productos de distorsión de las emisiones otoacústicas se realizó tras la estimulación con tonos primarios f_1 y f_2 , con una relación $f_2/f_1=1,2$. Para la emisión de f_1 y f_2 y la posterior captación del sonido producido por el movimiento de las células ciliadas, se empleó una sonda conjunto de captación microfónica de bajo ruido eléctrico y amplio realce de la señal Etymotic ER-10B+, la cual fue posicionada en el conducto auditivo externo del ratón con la ayuda de un adaptador elástico auto-confeccionado. La calibración de la sonda para determinar el grado de atenuación de las frecuencias primarias se realizó empleando un receptáculo sono-aislado de geometría cilíndrica y volumen conocido (*i.e.*, una jeringuilla de 1 ml) para simular el conducto auditivo externo del ratón con la ayuda del equipo TDT tal como se ha descrito previamente (Martin *et al.*, 2006). Debido a las limitaciones propias de la sonda empleada (cuya respuesta deja de ser lineal a partir de 10 kHz), se realizó esta prueba para las frecuencias de 8, 10, 14, 18 y 22 kHz. El cálculo de estas frecuencias se llevó a cabo multiplicando las frecuencias centrales (8 y 10 kHz) por los factores 0,909 (para f_1) y 1,09 (para f_2) [$f_2/f_1 = 1,20$]. Se realizaron barridos de intensidad decreciente de 80 a 30 dB SPL para cada par de frecuencias (150 promedios/intensidad). La sonda fue conectada a su vez a un amplificador de 100 a 50.000 microvoltios y el procesamiento de la señal y su posterior análisis se llevaron a cabo con la ayuda del software

BioSigRP™ (análisis en el espacio frecuencial mediante transformadas rápidas de Fourier; FFT). El estudio se centra en la componente frecuencial $2f1-f2$ de los DPOAE, que fue considerada positiva en caso de superar el ruido de fondo en 5 dB SPL, calculándose este como el promedio de la amplitud de 5 puntos marcados al azar a ambos lados de la componente $2f1-f2$.

4. Procedimientos experimentales invasivos para toma de muestras biológicas

4.1 Extracción de sangre y muestras frescas de tejido

Para la extracción de sangre y posterior toma de muestras de tejido, los animales fueron sacrificados con dióxido de carbono (CO₂). La extracción de sangre se llevó a cabo mediante punción en la vena maxilar externa (para mediciones iniciales) o mediante punción cardiaca (previo al sacrificio). Las muestras fueron depositadas bien directamente en tubos tipo eppendorf de 0,5 ml convencionales o heparinizados (Heparina Hospira 1%, 5000 IU, Laboratorios Farmacéuticos ROVI, Madrid) para la obtención de suero o plasma, o bien en tubos específicos para hematología recubiertos de EDTA-3K (Tapval-Aquisel, España) para la determinación de parámetros sanguíneos. Las muestras se centrifugaron a 2500 x g durante 10 minutos.

Tras la toma de sangre, se procedió a la rápida extracción de las diferentes muestras analizadas en función del modelo de estudio (cerebro, cóclea, vestíbulo y hueso). Se extrajeron tejidos adicionales para otros experimentos (hígado y riñón). Los fémures para la realización de las extensiones de médula ósea se extrajeron e introdujeron rápidamente en tampón fosfato salino estéril (PBS) para su posterior disección, mientras que el resto de muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron en un ultracongelador a -80°C hasta su uso (Forma 900 -86C ULT Freezer, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL).

4.2 Extracción de la cóclea/oído interno para análisis histológico

Para el estudio histológico de las muestras, los animales fueron inyectados con una sobredosis de pentobarbital sódico diluido al 10% (Dolethal®, Vetoquinol, Lure, Francia; 200 mg/ml). Tras observar la pérdida de reflejos, los animales fueron

perfundidos con PBS 1X frío (30 ml/100g de peso) y con paraformaldehído al 4% (PFA v/v: Merck, Darmstadt, Alemania; 2 ml/5g de peso). Seguidamente, se procedió a la extracción del hueso temporal y se diseccionaron los oídos medio e interno de las ratonas. Consecutivamente, las muestras se sometieron a una post-fijación en PFA al 4% en agitación suave durante 18 horas a 4°C. Tras este paso, se realizaron 3 lavados a 4°C con PBS 1X durante 5 minutos y los oídos internos fueron sumergidos en EDTA al 10% con pH 6,5 para su descalcificación. El proceso de descalcificación se realizó a 4°C en agitación constante y tuvo una duración de 5 a 10 días. La solución se cambió cada 3 días. Una vez finalizado el proceso de descalcificación se procedió al lavado con PBS y a la inclusión de muestras en parafina, gelatina o a la disección y montaje de tipo *whole mount* (Camarero *et al.*, 2001; Aburto *et al.*, 2012).

4.3 Extracción de otras muestras para análisis histológico

Una vez finalizada la perfusión se llevó a cabo la extracción, post-fijación, lavado, descalcificación (fémur durante 1 mes) e inclusión de las muestras de bazo y fémur de una forma semejante a la descrita anteriormente para los oídos internos.

5. Preparación y obtención de las secciones histológicas

5.1 Criopreservación y congelación

Los oídos internos fijados y descalcificados se incluyeron en soluciones crecientes de sacarosa al 15 y 30 % diluida en PBS 1X durante 24 horas cada una. Para realizar la inclusión del oído interno, las muestras fueron sumergidas en una solución de sacarosa al 15% (Sigma Aldrich) y de gelatina al 10% (Panreac Quimica, Castellar del Valles, Barcelona) diluidas en PBS 1X, durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron debidamente orientadas en moldes específicos y colocadas a 4°C hasta su solidificación. Estos bloques fueron tallados, congelados a -70°C en alcohol isopropílico (2-propanol; VWR International Eurolab S.L., Llinars del Vallés, Barcelona) mezclados con hielo seco, e inmediatamente almacenados en ultracongelador a -80°C hasta su procesamiento.

Las muestras de fémur fueron introducidas en una mezcla 1:1 de Optimal Cutting Temperature (O.C.T.; Tissue-Tek, Sakura, Holanda) con sacarosa al 15 y al 30% durante 24 horas cada una y, subsecuentemente, orientadas en un molde plástico para congelar y almacenadas.

5.2 Inclusión en parafina

Una vez lavadas, todas las muestras se sumergieron en etanol al 50% durante 2 horas y al 70% durante un mínimo de 24 horas. Seguidamente, fueron incluidas en soluciones crecientes de etanol (Merck) de 80, 96 y 100%, y en xilol (Scharlab, Sentmenat, Barcelona) 2 veces para su correcta deshidratación. Por último, las muestras se embebieron en parafina (Panreac Química) y se almacenaron a 4°C hasta la realización de secciones.

5.3 Microtomía

Los bloques de parafina fueron cortados en secciones de 7 µm de grosor con un micrótopo (Micrótopo automático Leica RM 2255) siguiendo planos de orientación paralelos al modiollo coclear obteniendo series alternas de 10 portaobjetos *superfrost* (Menzel Gläser) y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Una de cada 10 secciones fue teñida con hematoxilina-eosina (H&E; Fluka) o Tricrómico de Masson (Sigma Aldrich; HT1079) en función del estudio, para el estudio de la morfología coclear.

Por su parte, las criosecciones se obtuvieron a 10 µm mediante el uso de un criostato Cryocut 1900 (Leica Microsystems, Deerfield, Illinois, USA) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización para las técnicas de inmunohistoquímica o TUNEL.

6. Procesamiento y análisis de las muestras

Todas las medidas, determinaciones, tinciones e inmunohistoquímicas se realizaron en paralelo en muestras control y problema empleando los mismos tiempos de incubación y revelado.

6.1 Determinación de niveles de metabolitos en sangre

El procesamiento de las muestras de sangre para la determinación de metabolitos fue realizado en el laboratorio de Dr. Gregorio Varela-Moreiras en el departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación de la Universidad CEU San Pablo de Boadilla del Monte, Madrid.

6.1.1 Determinación de los niveles de Homocisteína

Los niveles de Hcy plasmática total (tHcy) se determinaron tras la derivatización de las muestras empleando el kit de reactivos para el análisis de Hcy en suero/plasma mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Munich, Germany). Durante la preparación de las muestras, se libera Hcy mediante centrifugación en presencia de reactivos reductores y precipitadores. Las muestras derivatizadas (50 μ l) se inyectaron en una columna de HPLC y se midió la fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 385 y 515 nm, respectivamente. Se emplearon muestras de al menos 5 animales de cada condición para las mediciones.

6.1.2 Determinación de los niveles de folato

La concentración total de folato en suero se realizó empleando el método microbiológico que utiliza *Lactobacillus casei* subespecie *rhannosus* (ATCC 7469), de acuerdo con el método descrito previamente por Horne y Patterson (Horne & Patterson, 1988) y modificado posteriormente por Tamura (Tamura *et al.*, 1990). Para ello, se crioprotegió *L. casei* siguiendo el método de Wilson *et al.* (Wilson & Horne, 1982), obteniéndose así un microorganismo estable durante al menos ocho meses, con un crecimiento reproducible y adecuado para usarse como fuente de inóculo en el análisis de folatos (Hyun & Tamura, 2005). Se siguieron las instrucciones del fabricante para preparar el caldo de cultivo específico para *Lactobacillus* (Lactobacillus Broth AOAC) y se esterilizó por filtración. En 1 ml de dicho caldo se resuspendió el *L. casei* (ATCC 7469), y se transfirió al resto del caldo de cultivo, incubándolo en estufa a 37°C durante toda la noche. Tras la incubación, se prepararon 100 ml de medio específico para la determinación de la concentración de ácido fólico. El medio se hirvió, enfrió, se añadieron 0,5 ml de una solución de fólico 3 μ g/ml, y se esterilizó por filtración. A

continuación, se inocularon 50 ml de este medio con 0,25 ml del caldo anterior y se incubó a 37°C. Tras 18 horas de incubación, se comprobó el correcto crecimiento del cultivo, midiendo la absorbancia a una λ de 600 nm. Los valores de absorbancia se consideraron adecuados entre 0,8 y 1, tomando el medio específico con ácido fólico sin inóculo como “blanco”. Una vez obtenido el medio específico inoculado en condiciones óptimas de crecimiento, se mezcló con igual volumen de glicerol al 80% (v/v) estéril. La mezcla se agitó en hielo durante 1 hora, se realizaron alícuotas y estas se almacenaron en ultracongelador a -80 °C hasta su utilización. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Las muestras de suero se diluyeron en ascorbato sódico al 0,5% en una dilución 1:10 (w/v). El medio específico para la determinación de la concentración de folato fue preparado de acuerdo con las indicaciones del fabricante y fue esterilizado por filtración. El inóculo de *L. casei* se preparó mezclando 1 ml del microorganismo crioprotegido con 50 ml de cloruro sódico al 0,9% estéril. Se adicionaron 2 ml de este inóculo diluido a 100 ml de medio específico. A continuación, se procedió al análisis de folato total como anteriormente se ha descrito. Se emplearon al menos 5 animales de cada condición para las mediciones.

6.1.3 Determinación de los niveles de vitamina B6

La determinación de vitamina B6 en plasma, se realizó empleando un HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, con un kit comercial de Chromsystem (Teknokroma, Barcelona, España). Se utilizaron muestras de al menos 11 animales de cada condición para las mediciones.

6.2 Preparación y tinción de las extensiones de sangre y médula ósea

En el caso del modelo I, se destinaron 2 pequeñas gotas (aproximadamente 20 μ l) de sangre fresca completa de cada animal para realizar 2 extensiones de sangre con fines diagnósticos. La manipulación de los fémures se llevó a cabo en campana bajo condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones. Inicialmente, se extirparon las epífisis y se realizó un corte longitudinal de la diáfisis con la ayuda de un bisturí. A continuación se realizó la técnica de “*pintado medular*” (Reagan *et al.*, 2011). Para llevar a cabo este procedimiento, se humedeció un pincel del N°0 en un solución estéril de BSA al 5% pasándolo varias veces por el canal medular y se realizaron 3-4 pases

firmes sobre un portaobjetos de tipo *superfrost* (Menzel Gläser) para conseguir una monocapa celular. Una vez secas las extensiones de sangre y médula se fijaron rápidamente en una solución de metanol en coplin durante 5 minutos y se dejaron secar en posición vertical (70°) hasta la evaporación del mismo. Una vez secas, se colocaron los portaobjetos en posición horizontal y se tiñeron con 1 ml de reactivo de Wright (Sigma Aldrich) durante 2 minutos en agitación suave. Sin retirar el colorante se añadió 1 ml de agua destilada a cada portaobjetos y se dejaron en agitación durante 2 minutos más. Posteriormente los portaobjetos se lavaron y montaron con Entellan (Merck).

6.3 Estudio hematológico

Las muestras de sangre se analizaron con un analizador hematológico automático basado en el principio *Coulter* (Abacus Junior Vet 5, Diatron, Budapest, Hungría). Una vez finalizado el análisis (45 segundos), la sangre fue centrifugada y los volúmenes plasmáticos obtenidos congelados para determinaciones posteriores. Se determinaron los siguientes parámetros: glóbulos blancos totales (WBC), volumen corpuscular medio (VCM), glóbulos rojos (RBC), concentración de hemoglobina (Hgb), hematocrito (HTC), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), porcentaje de linfocitos (LY), porcentaje de células de rango medio (MI) y porcentaje de granulocitos (GR). Al mismo tiempo, se realizó una determinación del porcentaje de hematocrito por microcentrifugación. Se adquirieron las muestras de sangre en tubos capilares heparinizados (BD capilares de micro-hematocrito plastificados; BD, San Agustín de Guadalix, Madrid, España), se taponó la parte seca con plastilina y se colocaron en una microcentrífuga durante 5 minutos. La lectura se realizó midiendo la distancia ocupada por los hematíes frente a la distancia total ocupada por el plasma tanto manualmente como mediante una tabla de nomograma.

6.4 Técnicas de inmunodetección

6.4.1 Inmunohistoquímica en cortes de parafina

Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas en xilol, soluciones decrecientes de etanol (100, 96, 70 y 50%) y finalmente agua destilada. Seguidamente, se inactivó la peroxidasa endógena durante 20 minutos con peróxido de hidrógeno al

3% (v/v; Merck, Darmstadt, Alemania). Las secciones fueron permeabilizadas en PBS/Tritón-X-100 (PBS-T) al 0,05 % y los lugares de unión inespecíficos del tejido se bloquearon durante 40 minutos con suero normal de conejo o burro, diluidos en PBS-T al 0,05%. Las secciones se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios en cámara húmeda, se lavaron y se añadieron los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con biotina durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último se añadieron los anticuerpos terciarios con peroxidasa de rábano ligada a avidina (1:300 v/v; Sigma-Aldrich) durante 90 minutos a temperatura ambiente. La reacción de coloración se llevó a cabo añadiendo el sustrato tetrahidrocloruro de 3-3'diaminobenzidina (DAB, D5337, Sigma Aldrich) diluido en PBS a una concentración de 0,5 mg/ml y H₂O₂ a 0,01%. La reacción se detuvo con PBS frío, se sumergieron las muestras en agua destilada, y las preparaciones se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 96 y 100), xilol y finalmente, se montaron con Entellan (Merck). Las diluciones y características de los anticuerpos primarios, secundarios y terciarios se pueden consultar en la *Tabla 3*. Todas las imágenes de campo claro se obtuvieron empleando una cámara digital Olympus DP70 montada sobre un microscopio Zeiss.

6.4.2 Inmunohistoquímica en cortes de congelado y en *whole mount*

Las criosecciones se colocaron a -20°C durante una hora y posteriormente se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se fijaron en PFA al 4% durante 10 minutos y se lavaron con PBS. Para la técnica de *whole mount* se colocaron las muestras en una placa de micropocillos y se permeabilizó el tejido con lavados de PBS-T cada 20 minutos. Los pasos de bloqueo e incubación con anticuerpos primarios y secundarios fueron iguales a los descritos en el apartado 6.4.1 (ver *Tabla 3*). La histoquímica de *faloidina Alexa-488* se realizó incubando las secciones directamente con el compuesto diluido en PBS durante 15 minutos (1:100 v/v; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Las secciones se montaron con Prolong Gold con DAPI (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) o Vectashield con DAPI (Vector Labs, Palex Medical S.A., Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España) y las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron en un microscopio de fluorescencia Nikon 90i o en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Wetzlar, Alemania).

6.4.3 Microscopía, análisis estadístico y cuantificación celular

La toma de fotografías y el densitometrado para la cuantificación de 3-nitrotirosina (3-NT) se llevó a cabo siguiendo los protocolos empleados previamente (Murillo-Cuesta *et al.*, 2012). Para la estimación de la densidad óptica, se convirtieron las imágenes a escala de grises y en cada una de ellas se dibujaron áreas a mano alzada de la estría vascular y el ganglio coclear con la ayuda del programa ImageJ v. 1.37 (ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Se estudiaron 3 secciones consecutivas para cada región y se sacaron al menos dos fotografías para cada estructura. Se empleó el mismo procedimiento para las cuantificaciones de las inmunohistoquímicas de mielina P0 y Kir.4.1.

La determinación de la relación de intensidad relativa del ganglio coclear se llevó a cabo en secciones de parafina teñidas con H&E con ayuda del programa ImageJ v. 1.37. Una de cada 5 preparaciones fue analizada con el fin de tener un mínimo de cuatro secciones representativas de cada animal y región coclear incluida. Se emplearon entre 4 y 6 animales por grupo.

6.5 Detección de la muerte celular mediante TUNEL

El estudio de la muerte celular se realizó en criosecciones empleando el kit de detección de apoptosis *ApoTag Plus Peroxidase In Situ* (Chemicon, Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se fijaron en PFA al 1% a temperatura ambiente durante 10 minutos, se lavaron dos veces en PBS, y se realizó una post-fijación en etanol: acético (2:1) a -20°C durante 5 minutos. A continuación, las preparaciones se lavaron, se bloqueó la peroxidasa endógena (3%, 20 minutos), se lavaron nuevamente, y se les añadió el buffer de equilibrado en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante un mínimo de 10 minutos. Seguidamente, las muestras se incubaron a 37°C con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) durante una hora. Se empleó el reactivo específico incluido en el kit para parar la reacción, se realizaron varios lavados de un minuto y se incubaron las muestras con el sistema digoxigenina/anti-digoxigenina. El cromógeno elegido para la reacción final fue el DAB, cuyos cambios se monitorizaron bajo microscopio. Finalmente, las secciones se deshidrataron y se montaron con Entellan (Merck). Como controles positivos de la

reacción se emplearon cortes de cóclea tratados con DNasa I (D7291; Sigma-Aldrich) y tejido mamario de rata tras el destete, tal y como recomienda la casa comercial (ApopTag® Positive Control Slides, S7115; Millipore). Se omitió la enzima TdT para obtener el control negativo.

6.5.1 Microscopía y cuantificación celular

Las fotos para la cuantificación de las células positivas para TUNEL se sacaron siguiendo las especificaciones anteriormente descritas en el apartado 6.4.3 sobre la cuantificación de intensidad relativa de 3-NT y Mielina P0. En cada fotografía se estableció una región de interés (ROI) tanto para el órgano de Corti ($42 \times 103 \mu\text{m}^2$), como para la estría vascular ($40 \times 103 \mu\text{m}^2$). Las células se consideraron como negativas cuando se observó un marcaje citoplasmático difuso sin una clara participación del núcleo. Se utilizaron 4 secciones por animal y 4 animales por grupo. Se presentan los resultados como células positivas por área (μm^2).

6.6 Determinación de los niveles de glutatión

Los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se midieron mediante el método de Tietze modificado por Rahman y cols. (Rahman *et al.*, 2006) en el laboratorio de la Dra. María de los Ángeles Pajares Tarancón en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid. Para llevarlo a cabo, se homogeneizaron dos cócleas en una solución de tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7,5 con EDTA 5 mM y ácido sulfosalicílico al 0,6% (w/v; 250 μ l). Las muestras fueron centrifugadas a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C, y el extracto resultante se empleó para la determinación de GSH (1:10 v/v) y GSSG (1:2 v/v) colorimétricamente.

6.7 Extracción de proteínas y Western Blotting

Para la extracción de proteínas de la cóclea se preparó una solución tampón RIPA de homogenización (ver Anexo 1) junto con un cóctel de inhibidores de proteasas y de fosfatasas, ambos a 1:100 (Sigma P8340 y P5726, respectivamente). Se disgregó la muestra sobre nieve carbónica en 100 μ l de la mezcla inicialmente con un vástago metálico hasta obtener pequeños fragmentos, y posteriormente utilizando un homogeneizador eléctrico a baja velocidad para terminar de lisar la muestra por

completo. Seguidamente se calentaron las muestras a 95°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 11.800 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, se guardó una alícuota para la determinación de la concentración de proteínas y el resto se mezcló con tampón Laemmli al 1:1 (v/v; ver Anexo 1) y β - mercaptoetanol al 10%. Se hirvieron las muestras a 95°C durante 10 minutos y se congelaron a -80°C hasta su utilización. Se cargaron cantidades equivalentes de proteína determinadas mediante el kit BCA de Pierce (Thermo Scientific) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se cargaron 200 μ g de cada muestra en geles SDS-PAGE al 8, 10, 12 y 15 % en función del peso molecular de la proteína en estudio, a 125 V durante 2 horas. Se realizó posteriormente una transferencia húmeda a 30mA durante 90 minutos a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) y PVDF activada en metanol (WestranC, Whatman, Inc.), ambas previamente equilibradas en tampón de transferencia (Anexo 1). Las membranas se bloquearon durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente con una solución de tampón Tris salino con Tween20 al 0,1% (TBS-T) y un 5 % de BSA ó de leche en polvo desnatada, empleados para cada anticuerpo en función de las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS-T con leche desnatada o BSA al 1 % y se incubaron a 4°C en agitación durante toda la noche. Se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa correspondiente, diluido del mismo modo que los anticuerpos primarios.

Cuando se indica en el texto, la técnica de *Western blotting* hubo de modificarse debido a la necesidad de emplear únicamente una cóclea para el análisis. Así, para la extracción de proteínas se empleó el kit de extracción ReayPrep (#163-2086). La concentración de proteínas se midió mediante el kit RC DC (#500-0122) empleando BSA como estándar de concentración. Las muestras (100 μ g) se cargaron en geles de poliacrilamida del 10% o de tipo Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ (#456-1033, #456-9033). La transferencia se llevó a cabo en membranas de PVDF o nitrocelulosa (#170-4157 ó #170-4159) mediante el uso del aparato Trans-Blot® Turbo™ (#170-4155). Todos los reactivos y kits se obtuvieron de los Laboratorios Bio-Rad S.A. Tanto la electroforesis como la incubación con anticuerpos, los lavados y la normalización de los resultados, se realizaron del mismo modo que en el protocolo ya descrito.

El revelado de la señal se realizó mediante quimioluminiscencia enzimática empleando los reactivos Clarity Western ECL (#170-5060) y ECL (GE Healthcare S.A.) y, seguidamente, las membranas se expusieron a películas autorradiográficas (Konica Minolta) o se digitalizó la señal con la ayuda del sistema ImageQuant LAS4000 mini durante tiempos variables en función del anticuerpo. El densitometrado de las bandas obtenidas se llevó a cabo con los programas ImageJ v. 1.37 e ImageQuant TL (GE Healthcare). La normalización de los valores se realizó utilizando las señales de β -tubulina o β -actina. Los valores medios para la condición control se consideran como 100%. Se emplearon como mínimo 6 animales de cada grupo para cada anticuerpo analizado.

6.8 Extracción de ARN y reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-qPCR)

Se empleó el kit RNeasy (Qiagen) para el aislamiento del ARN total de cada par de cócleas. Su calidad y cantidad fueron determinadas espectrofotométricamente con la ayuda del Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). La retro-transcripción se realizó empleando 1,25 μ g de ARN total de cada muestra con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies). Las muestras fueron procesadas en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid. La amplificación del ADNc (10 ng) se realizó por triplicado utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de interés (ver *Tabla 4*) y la Master Mix para PCR de SYBR Green (Applied Biosystems) o sondas TaqMan (ver *Tabla 5*). Para ello se empleó el sistema ABI 7900HT para PCR en tiempo real.

Los oligonucleótidos para la amplificación de *Cbs* y *Adk* se diseñaron de modo que se permitiese la amplificación de las dos formas de *splicing* que han sido descritas hasta la fecha de cada uno de ellos. La señal fluorescente fue recogida tras cada ciclo de elongación y las curvas fueron analizadas con el programa SDS 2.2.2. Los genes endógenos empleados fueron el ARN ribosómico *18s* y la proteína ribosomal *Rplp0*. Se calcularon las eficiencias experimentales para cada transcrito y posteriormente, se usaron para obtener los valores de *fold change* o diferencia de expresión siguiendo los métodos de Pfaffl y Livak (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Los genes y referencias de los oligonucleótidos empleados, se pueden consultar en la *Tabla 4*.

6.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del software IBM SPSS statistics 22. En función del número de grupos analizado, se realizó una T de Student o una ANOVA de una vía con post-hoc de Bonferroni comparando en cada caso el valor control con los valores problema. Los valores se muestran como media \pm ESM.

Anticuerpo primario	Tipo	Proveedor (#Cat)	Dilución (v/v)	Anticuerpo secundario	Proveedor (#Cat)	Dilución (v/v)	Técnica *
Neurofilamento	MouM	Novus Biologicals (NB100-1607)	1:100	Anti -anticuerpo de ratón hecho en burro marcado con Alexa Fluor 546	Molecular Probes (A21206)	1:300	IHF
Miosina VIIa	RbP	Proteus (#: 25-6790)	1:150	Anti -anticuerpo de conejo hecho en burro marcado con Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A21206)	1:300	IHF
Mielina P0	CkP	Novus Biologicals (NB100-1607)	1:100	Anti -anticuerpo de pollo hecho en conejo conjugado con biotina	Acris Antibodies (R1300B)	1:300	IC-P***
3-nitrotirosina	RbP	Millipore (AB5411)	1:200	Anti -anticuerpo de conejo hecho en cabra conjugado con biotina	Chemicon-Millipore (AQ132B)	1:300	IC-P**
Kir4.1	RbP	Chemicon (AB5818)	1:200	Anti -anticuerpo de conejo hecho en burro marcado con Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A21206)	1:400	IHF
β -actina	MouM	Sigma (A5441)	1:5000	Anti -anticuerpo de ratón hecho en oveja conjugado con HRP	GE Healthcare (NA931)	1:5000	WB
α -Tubulina	MouM	Sigma (T9026)	1:2500			1:20000	
CBS	MouP	Abnova (H00000875-A01)	1:2500				
BHMT	RbM	González et al. (Gonzalez <i>et al.</i> , 2003)	1:5000	Anti-anticuerpo de conejo hecho en cabra conjugado con HRP	Bio-Rad (170-6515)	1:5000	WB
ADK	RbP	Abcam (ab88903)	1:500			1:3000	
Hcy	RbP	Chemicon-Millipore	1:1000			1:5000	
p22phox	RbP	Santa Cruz (sc-20781)	1:500	Anti -anticuerpo de cabra hecho en burro conjugado con HRP	Santa-Cruz (sc-2020)	1:10000	WB
MnSOD	RbP	Upstate Millipore (06-984)	1:2500			1:3000	
NOX3	RbP	Abcam (ab82708)	1:1000			1:5000	
AHCY	GtP	Santa Cruz (sc-66759)	1:1000	Anti -anticuerpo de cabra hecho en burro conjugado con HRP	Santa-Cruz (sc-2020)	1:10000	WB
MTR	GtP	Abnova (PAB6022)	1:250			1:3000	
ADA	GtP	Santa Cruz (sc-7451)	1:2500			1:5000	
NOX4	GtP	Santa Cruz (sc-21860)	1:500			1:3000	

Tabla 3. Lista de los anticuerpos empleados indicando las diluciones usadas para las diferentes técnicas.

*Las abreviaturas se corresponden con: IC-P, inmunohistoquímica en parafina; IHF, inmunohistoquímica en parafina; WB, Western blotting.

Gen	Bases	Forward primer (5'-3')	Bases	Reverse primer (5'-3')	nM
<i>Ada</i>	641-663	GGGATGAGACCAATTGAAGGAAGT	709-689	TCTTTACTGCGCCCTCATAGG	300
<i>Adk</i>	883-903	AGAGGCAGAGGACCCTGATCT	946-925	TCATTCTCTGCAGCCACTATGG	300
<i>Bhmt</i>	672-692	CAGAAATCCCCCTTTGGATTGG	742-721	GGCCCTCTCTGGCATAATTTTTGA	300
<i>Bhmt2</i>	143-166	CTCCAGAAAGCAGTGGTAGAACATC	217-198	CATCAGCTCCCGCTCTCAAG	300
<i>Cbs</i>	1274-1292	GCAGCGCTGTGTGTCATC	1337-1312	GTCACCTCAGGAACTTGGACATGTAGT	300
<i>Cth</i>	190-212	CAGTCCCTCGGTTTTTGAATACAG	260-241	GCAGCCACTGCTTTTTCCAA	300
<i>Ahcy</i>	1531-1554	TCGAAAGTGTCCTCAATGTTACAGACA	1592-1575	CTTGGCCGGCACTTTGAG	300
<i>Mtr</i>	2006-2026	CGCGATCAAGTTTGGTATGGA	2080-2057	TCCTTGTGGATAGCATCATACACA	300
<i>Mat1a</i>	1285-1307	GGTGTATTGTCAGGGACTTGGGA	1347-1329	GCCGTAGCACGCCAGTCTTC	300
<i>Mat2a</i>	1057-1079	GGAGGGTTCTTGTTCAGGTCTCT	1123-1102	TGGAAAATGGAGATCGACAATG	300
<i>Mat2b</i>	134-153	GCTGGTGGAGGAGGAAGTGA	192-173	CAGTGGCACCCGGTAATGAGA	300
<i>Rn18s</i>	1645-1666	CCAGTAAGTGCGGGTGCATAAGC	1737-1716	CCTCACTAAACCATCCAAATCGG	100

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en la qPCR. Los oligonucleótidos adecuados se diseñaron con la ayuda del programa Primer Express 3.0 y las secuencias genéticas del ratón disponibles en el banco de datos con las siguientes referencias: NC_000068.6 (*Ada*); NC_000080.5 (*Adk*); NW_000085.1 (*Bhmt*); NC_000079.5 (*Bhmt2*); NC_000083 (*Cbs*); NT_039207 (*Ahcy*); NC_000069.6 (*Cth*); NC_000079 (*Mtr*); NC_000080.5 (*Mat1a*); NC_000072.5 (*Mat2a*); NC_000077.5 (*Mat2b*). Las bases indican la localización de las secuencias de los oligonucleótidos en el gen correspondiente. En la columna de la derecha se muestran las concentraciones de los oligonucleótidos empleadas para la detección con SYBR Green.

Gen	Proteína	Referencia Taqman
<i>Cat</i>	Catalasa	Mm00437992_m1
<i>Cyba (p22phox)</i>	Citocromo b-245 (o p22phox)	Mm00514478_m1
<i>Dusp1 (MKP1)</i>	Fosfatasa de especificidad dual 1	Mm00457274_g1
<i>Foxm1</i>	Forkhead box M1	Mm00514924_m1
<i>Gap43</i>	Proteína asociada al crecimiento 43	Mm00500404_m1
<i>Gclc</i>	gamma-glutamilcisteína sintetasa	Mm00802655_m1
<i>Gpx1</i>	Glutación peroxidasa 1	Mm00656767_g1
<i>Gpx4</i>	Glutación peroxidasa 4	Mm00515041_m1
<i>Gsr</i>	Glutación reductasa	Mm00439154_m1
<i>Gss</i>	Glutación sintetasa	Mm00515065_m1
<i>Igf1</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina I	Mm00439561_m1
<i>Igf1r</i>	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I	Mm00802831_m1
<i>Il10</i>	Interleuquina 10	Mm00439614_m1
<i>Il1b</i>	Interleuquina 1β	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Interleuquina 6	Mm00446190_m1
<i>Mapk14 (p38a)</i>	Proteína quinasa activada por mitógenos 14	Mm01301009_m1
<i>Mef2a</i>	Factor potenciador 2A de miocito	Mm01318991_m1
<i>Mef2c</i>	Factor potenciador 2C de miocito	Mm00600423_m1
<i>Mef2d</i>	Factor potenciador 2D de miocito	Mm00504931_m1
<i>Nox4</i>	NADPH oxidasa 4	Mm00479246_m1
<i>Nox3</i>	NADPH oxidasa 3	Mm01339132_m1
<i>O3fa1 (Gpr120)</i>	Receptor 1 de ácidos grasos omega-3	Mm00725193_m1
<i>Rn18S</i>	ARN ribosómico 18S	Mm04277571_s1
<i>Rplp0</i>	Proteína ribosomal grande P0	Mm00725448_s1

Tabla 5. Sondas Taqman empleadas en la qPCR.

RESULTADOS



RESULTADOS

I. Estudio del efecto de la dieta deficiente en ácido fólico en ratones C57

1. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el peso a los 4 meses de edad

El déficit de ácido fólico a las pocas semanas ha sido empleado en otros estudios sin que esto implique cambios en los niveles de ingesta o el peso de los animales (Partearroyo *et al.*, 2010; Partearroyo *et al.*, 2013). Así, tras 8 semanas de dieta, las ratonas del grupo deficiente no mostraron diferencias en el peso con respecto al grupo control (Control $21,6 \pm 0,3$ g. vs Deficiente $22,2 \pm 0,1$ g.; $p > 0,05$).

2. Efecto del déficit en ácido fólico sobre los niveles de homocisteína, folato y vitamina B6 a los 4 meses de edad

El déficit nutricional de ácido fólico tiene como consecuencia directa el descenso en los niveles de folato en sangre provocando el aumento en los niveles de homocisteína total (tHcy) (Bailey & Caudill, 2013). A la misma edad y con el fin de comprobar los efectos del tratamiento se midieron los niveles plasmáticos y en suero de Hcy, folato y vitamina B6 en los animales alimentados con dieta control y deficiente en ácido fólico. El grupo deficiente presentó una disminución severa en los niveles de folato (de aproximadamente 7 veces) y un aumento en la concentración de tHcy (de aproximadamente 3 veces) con respecto al grupo control (*Figura 10*). Los niveles de vitamina B6 permanecieron sin cambios entre ambos grupos.

Por tanto, estos resultados muestran que la dieta resultó efectiva a la hora de generar una deficiencia sistémica en folato así como una hiperhomocisteinemia.

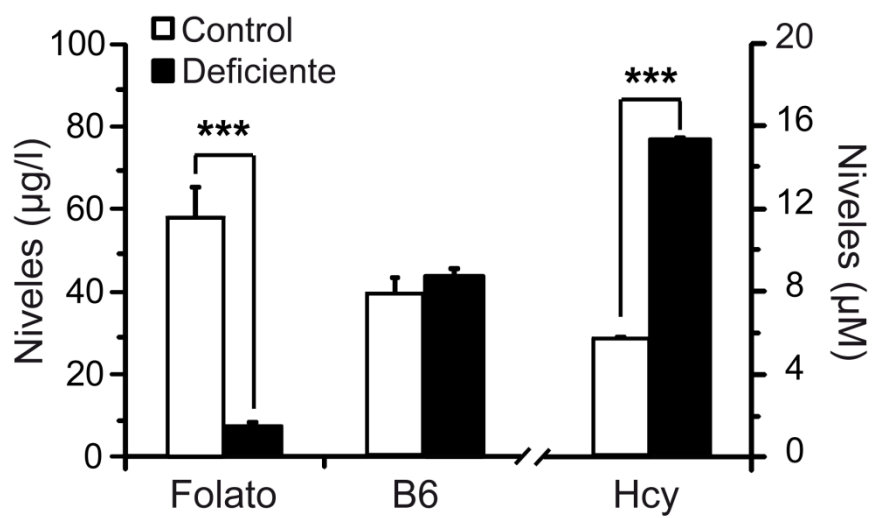


Figura 10. Niveles en suero y plasma de folato, vitamina B6 y Hcy de los grupos control y deficiente en folato a los 4 meses de edad. Los niveles de ácido fólico en suero [$50,85 \pm 22,03$ (n=10) frente a $7,46 \pm 3,88$ µg/l (n=11)], homocisteína en plasma [tHcy; $5,05 \pm 2,45$ (n=33) vs. $14,70 \pm 3,19$ µM (n=69)] y vitamina B6 en plasma [$40,00 \pm 15,71$ (n=11) vs. $43,71 \pm 8,74$ µg/l (n=18)] se midieron como se especifica en la sección de Material y Métodos a los 4 meses de edad. La figura muestra la media ± ESM de cada grupo y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $p < 0,001$ (***).

3. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la función auditiva a los 4 meses de edad

Los animales del grupo control mostraron un promedio de normo-audición, mientras que las ratonas C57 del grupo deficiente mostraron una sordera de moderada (34%) a severa/profunda (66%). Los ratones deficientes mostraron un aumento medio de 45 dB de los umbrales auditivos en respuesta a click. De acuerdo con esto, se observó un aumento significativo de los umbrales auditivos para todas las frecuencias estudiadas, aunque el efecto fue más acusado en las altas (diferencia de umbral de 50 dB) que en las bajas frecuencias (diferencia de umbral de 20 dB; *Tabla 6* y *Figura 11A-B*). El estudio de las ondas de ABR reveló un retardo significativo únicamente en la latencia de la onda I en el grupo deficiente con respecto al grupo control. Además, se observó una dramática reducción de la amplitud de dicha onda (52%) y también de la de la onda II (54%; *Figuras 11C-D* y *12A*; *Tablas 7* y *8*). No se encontraron diferencias en la función de latencia-intensidad de la onda IV cuando se determinaron a intensidades situadas a 20 dB por encima del umbral (*Figura 12B*). Sin embargo, sí pudo observarse un descenso progresivo de la proporción de amplitud-intensidad de la onda IV en el grupo deficiente (*Figura 12C*). Los valores de las latencias interpico permanecieron sin cambios (*Figura 12D*). Solamente se emplearon los animales con sordera severa/profunda para el resto de experimentos.

Estos datos indican que el déficit en ácido fólico tiene un efecto negativo sobre la función auditiva.

	Control	Deficiente
n	21	21
Umbral ABR (dB SPL)		
Click	21 ± 1	65 ± 3
8 kHz	26 ± 2	56 ± 4
16 kHz	25 ± 2	75 ± 5
20 kHz	27 ± 1	83 ± 3
28 kHz	28 ± 2	83 ± 4
40 kHz	32 ± 2	88 ± 2

Tabla 6. Promedio de los umbrales click y tonos puros de 8, 16, 20, 28 y 40 kHz (dB SPL), para los grupos control y deficiente en fónico. Se encontraron diferencias significativas para todas las frecuencias estudiadas ($p < 0,001$). Se muestra la media \pm ESM.

	Control	Deficiente
n	21	21
Latencia (ms)		
Onda I	1,47 ± 0,02	1,62 ± 0,02 ^{***}
Onda II	2,45 ± 0,02	2,53 ± 0,03
Onda III	3,23 ± 0,03	3,31 ± 0,03
Onda IV	4,13 ± 0,03	4,18 ± 0,02
I-II	0,97 ± 0,01	0,91 ± 0,03
II-IV	1,69 ± 0,03	1,65 ± 0,03
I-IV	2,66 ± 0,03	2,56 ± 0,03

Tabla 7. Latencias pico (PL, en ms) e interpico (IPL en ms) por grupo experimental, estadísticos descriptivos. Se encontraron diferencias significativas entre la latencia de la Onda I del grupo deficiente y la del control (^{***}; $p < 0,001$). Se muestra la media \pm ESM.

n	Control	Deficiente
	21	21
Amplitud (nV)		
Onda I	528 ± 45	277 ± 38 ^{***}
Onda II	974 ± 66	525 ± 57 ^{***}
Onda III	280 ± 37	231 ± 59
Onda IV	501 ± 57	453 ± 61

Tabla 8 Amplitud (nV) de las ondas I-IV por grupo experimental, estadísticos descriptivos. Se encontraron diferencias significativas en las amplitudes de las Ondas I y II del grupo deficiente con respecto al control (***, p<0,001). Se muestra la media ± ESM.

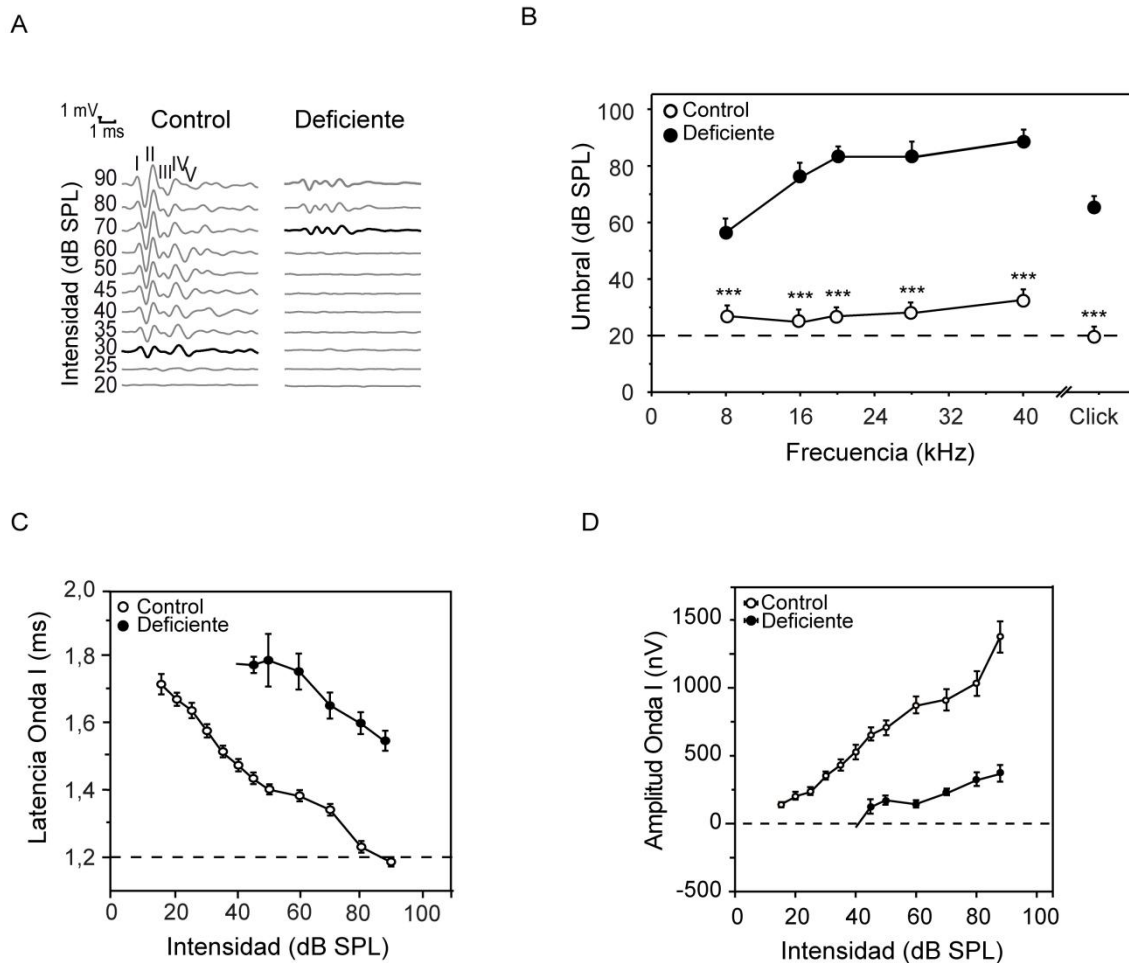


Figura 11. Las ratonas deficientes en folato muestran una pérdida auditiva prematura a los 4 meses de edad. Se analizó la respuesta auditiva de los ratones de los grupos control y deficiente en fólico. A. Ondas ABR en respuesta a click representativas de los ratones control (que muestra, normo-audición) y deficiente (que muestran sordera profunda). B. Umbrales ABR en respuesta a click y tonos puros en los ratones control y deficiente, tras 8 semanas de dieta (n=21/grupo). C. Función de latencia-intensidad para la onda I que muestra un retardo en la aparición de la misma en el grupo deficiente. D. Gráfico de amplitud-intensidad de la onda I que muestra un descenso de la misma en el grupo deficiente. Los círculos blancos representan al grupo control mientras que los negros se corresponden con el grupo deficiente en folato (n=21/grupo). Se muestran los resultados como la media \pm ESM $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

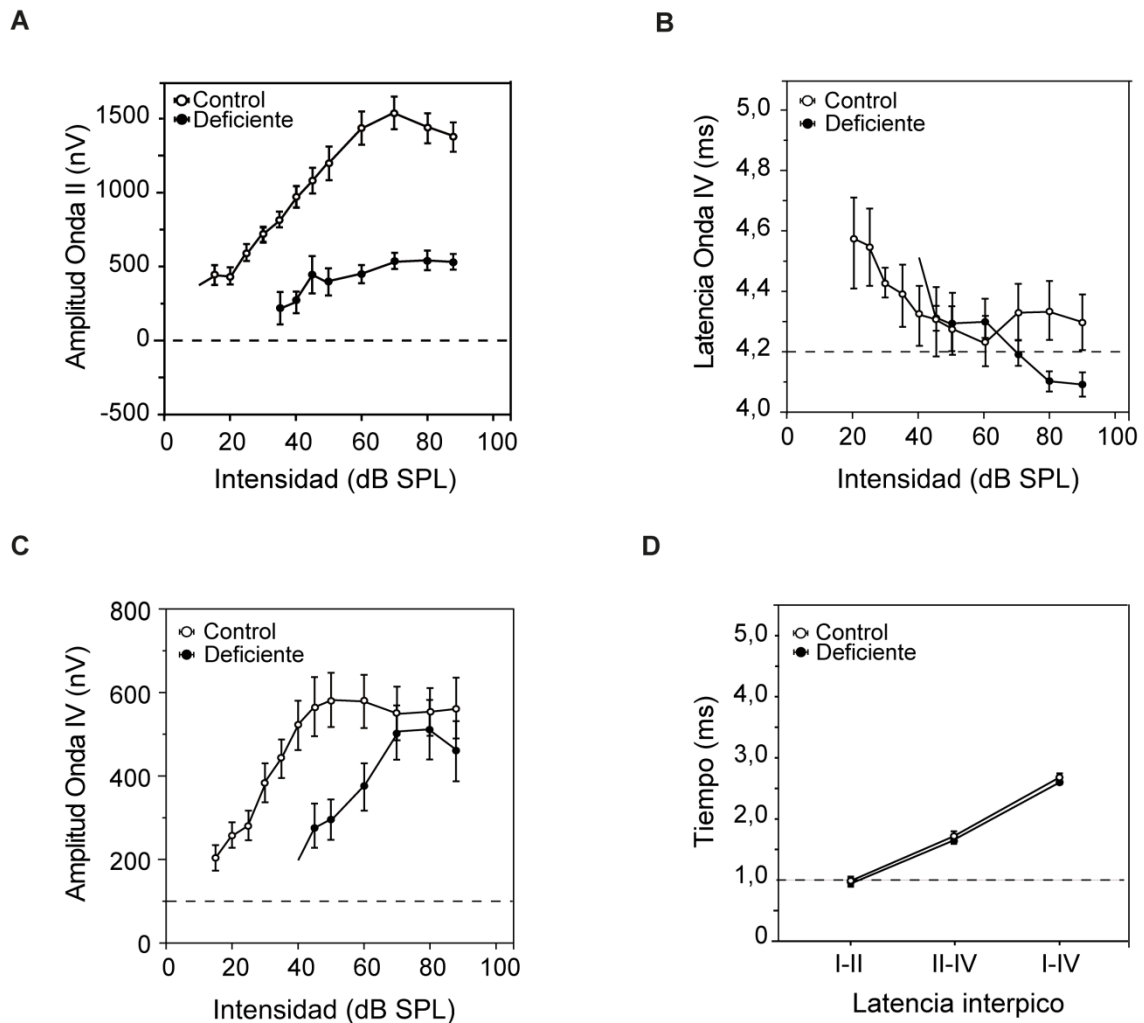


Figura 12. Funciones de relación de la intensidad con la latencia y la amplitud, para las ondas II y IV y gráfico de las latencias interpico a los 4 meses de edad. A. Gráfico de latencia-amplitud de la Onda II. B. Gráfico de latencia-intensidad de la onda IV. C. Imagen de amplitud-intensidad de la onda IV. D. Latencias interpico I-II, II-IV y I-IV en respuesta a click. Los círculos blancos representan al grupo control mientras que los negros se corresponden con el grupo deficiente en folato (n=21/grupo). Los valores se muestran como la media \pm ESM. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$ (*).

4. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la morfología coclear a los 4 meses de edad

Para observar los posibles cambios en la morfología coclear provocados por la falta de ácido fólico en la dieta de las ratonas C57, se realizó un análisis de histología básica e inmunohistoquímica. La citoarquitectura coclear se caracterizó por una pérdida celular generalizada en la región de la base en el grupo deficiente con respecto al control (*Figuras 13 y 14*). El grupo control presentó una estructura del órgano de Corti normal a lo largo de todas las vueltas de la cóclea (*Figura 13A, a-e*). Por el contrario, las ratonas del grupo deficiente mostraron un epitelio coclear plano en la región de la base (*Figura 13A, f-j*). Además, se encontraron células TUNEL-positivas tanto en el órgano de Corti como en la estría vascular en la media coclear exclusivamente en las ratonas deficientes en fólico (*Figura 13B-C*). En el momento estudiado, no se observaron células apoptóticas en la zona basal, dónde se observó el epitelio plano, ni en la región del ápex coclear. Conjuntamente, otras poblaciones celulares de la base y media cocleares resultaron afectadas en los animales del grupo deficiente con respecto al grupo control (*Figura 14*). Se encontró una pérdida de los fibrocitos tipo IV (compárense los paneles *A* y *B* con *J* y *K* de la *Figura 14*) y una reducción aproximada del 33% de la densidad ganglionar y de los niveles de mielina P0 ($p < 0,001$; compárense los paneles *D* y *E* con *M* y *N* y las cuantificaciones de *F*, *I* y *L*, de la *Figura 14*). No se mostraron diferencias en los niveles de mielina P0 en la media o el ápex entre ambos grupos (*Figura 14L*). Además, 5 de los 9 animales del grupo deficiente, mostraron una desorganización de los capilares de la estría y una acumulación de gránulos de melanina, a diferencia del grupo control que no mostró este fenotipo (compárense los paneles *G* y *H* con *P* y *Q* de la *Figura 14*; cuantificaciones en paneles *O* y *R*). No se encontraron diferencias en los niveles de Kir4.1 ($p > 0,05$; compárense los paneles *G'* y *H'* con *P'* y *Q'* de la *Figura 14*). Como complemento al estudio histológico, se analizaron los niveles de expresión de algunos genes con expresión en el órgano de Corti (*Figura 15*). *Mef2a* y *Mef2d* mostraron un ligero descenso mientras que *Foxp3* mostró un aumento de los niveles deficiente con respecto al control ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de *Gap43* y *Foxm1*.

Estos datos, junto con los obtenidos en el apartado anterior, muestran que el déficit nutricional en folatos causa una pérdida prematura de la función auditiva que cursa con alteraciones en la morfología coclear, siendo estos signos compatibles con los propios de la presbiacusia.

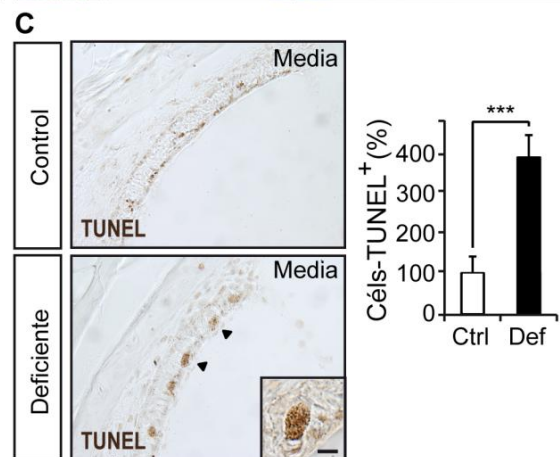
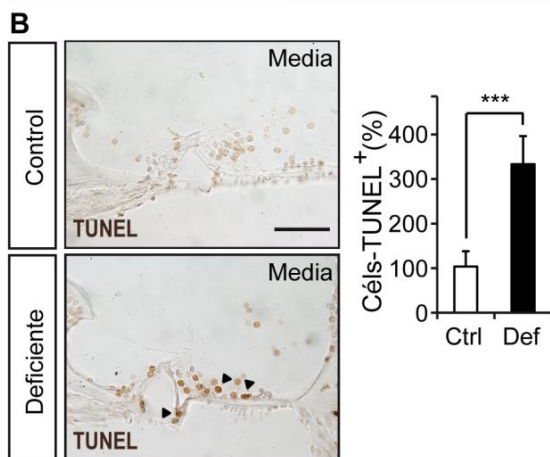
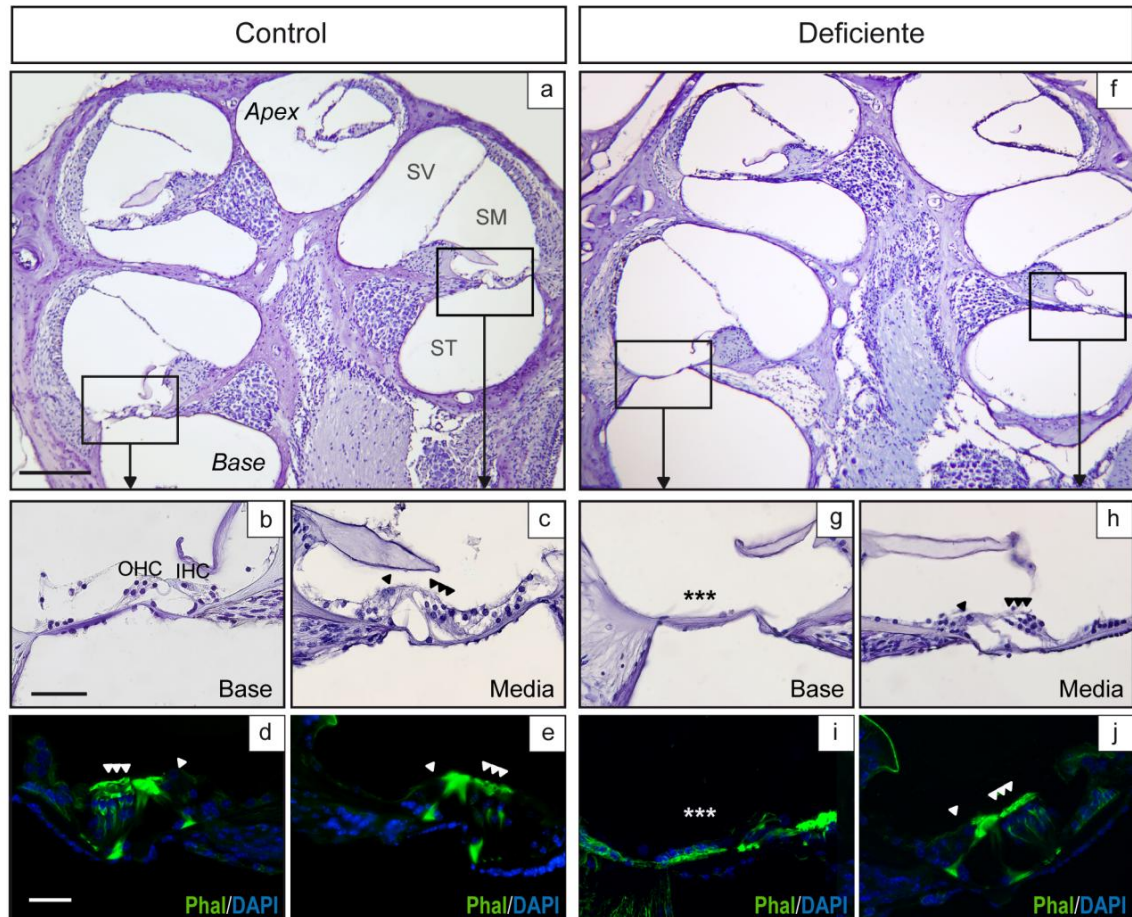


Figura 13. Las ratonas deficientes en folato muestran alteraciones en la morfología coclear y signos de apoptosis a los 4 meses de edad. El estudio de la citoarquitectura coclear y la muerte celular se llevaron a cabo mediante técnicas histoquímicas, de inmunohistofluorescencia y TUNEL. (A) Imágenes representativas de secciones del órgano de Corti en la base y media cocleares de los grupos control (a-e; n=6) y deficiente (f-j; n=9). La histoquímica de faloidina (Phal) en el órgano de Corti se muestra en los paneles d, e, i y j. En el panel g, las estrellas señalan el epitelio plano y la ausencia de células ciliadas en el órgano de Corti. (B). Imágenes representativas y cuantificación de la muerte celular mediante TUNEL en el órgano de Corti en un ROI determinado en la media coclear de ambos grupos. (C) Porcentaje de células TUNEL-+/ROI en la estría vascular del grupo deficiente con respecto al control (n=6 ratones por grupo experimental). IHC: células ciliadas internas; OHC: células ciliadas externas; SV: escala vestibular; ST: escala timpánica; SM: escala media. Barra de escala: 500 μm (a,f); 50 μm (d,e,i,j) y 25 μm (b,c,g,h). $p < 0,001$ (***)

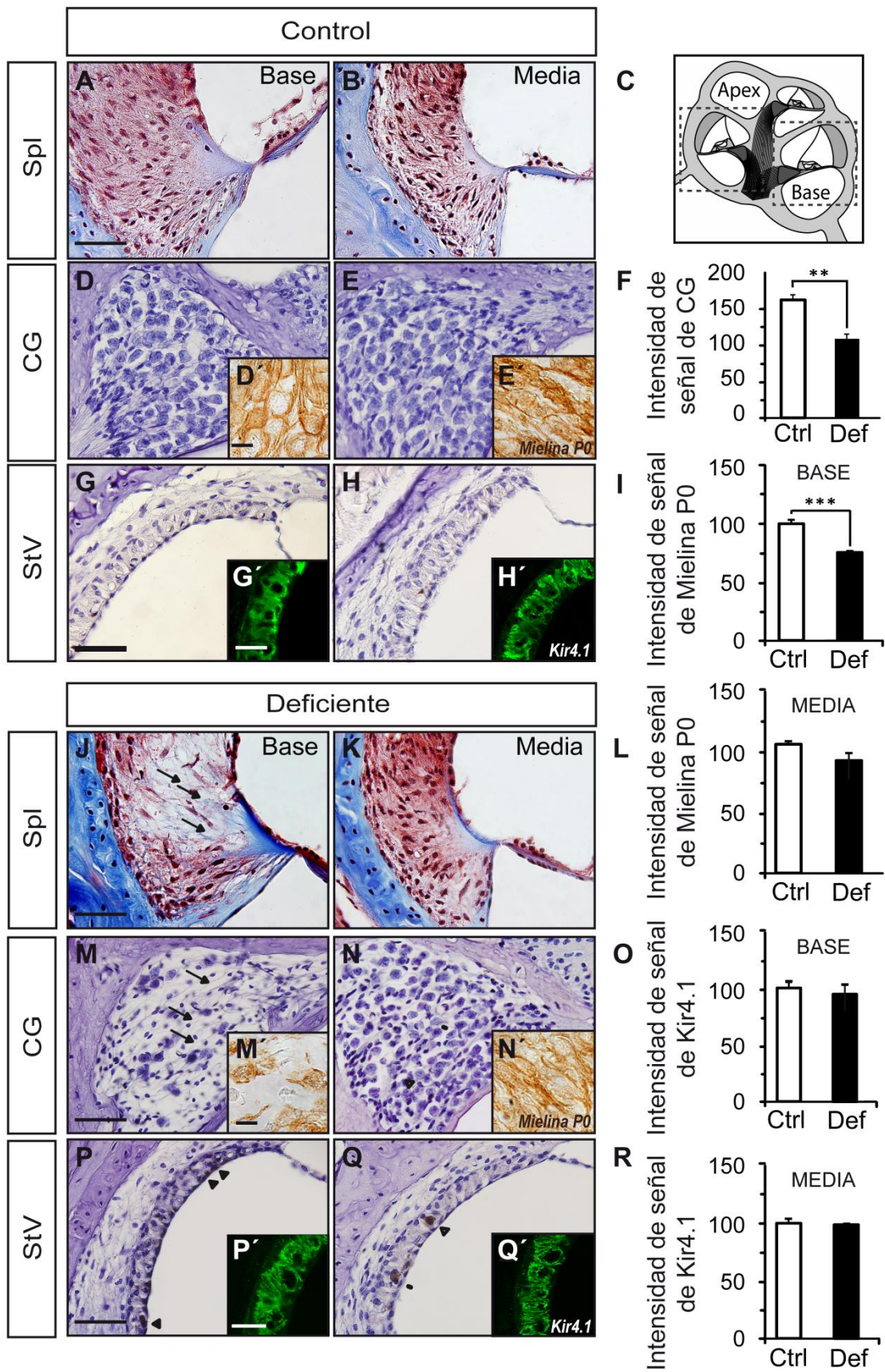


Figura 14. Las ratonas deficientes en folato muestran una morfología coclear alterada a los 4 meses de edad Se emplearon las técnicas de tricrómico de Masson y H&E o inmunofluorescencia para el estudio de los ratones control (A-H; n=6) y deficiente (J-Q; n=9). Se muestran detalles del ligamento espiral (Spl), ganglio coclear (CG) y la estría vascular (StV) en la base y media cocleares. Los paneles D, E, M y N muestran los resultados para la inmunohistoquímica de mielina P0 en el ganglio coclear. Por su parte, los paneles G, H, P y Q muestran detalles de la estría vascular marcada con el anticuerpo Kir4.1 (Kir4.1). Las flechas indican la ausencia de células (J, M). Barra de escala: 25 μm (A-H, J-Q y detalles dentro de G, H, P, Q); 10 μm (detalles dentro de D, E, M, N). El panel C muestra un esquema de la cóclea. La intensidad de señal (0 a 256 en escala de grises) fue cuantificada en n=4 muestras de ratonas control y n=6 muestras de ratonas deficientes. Los resultados se muestran como media \pm ESM en los histogramas de los paneles F, I, L, O y R. $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

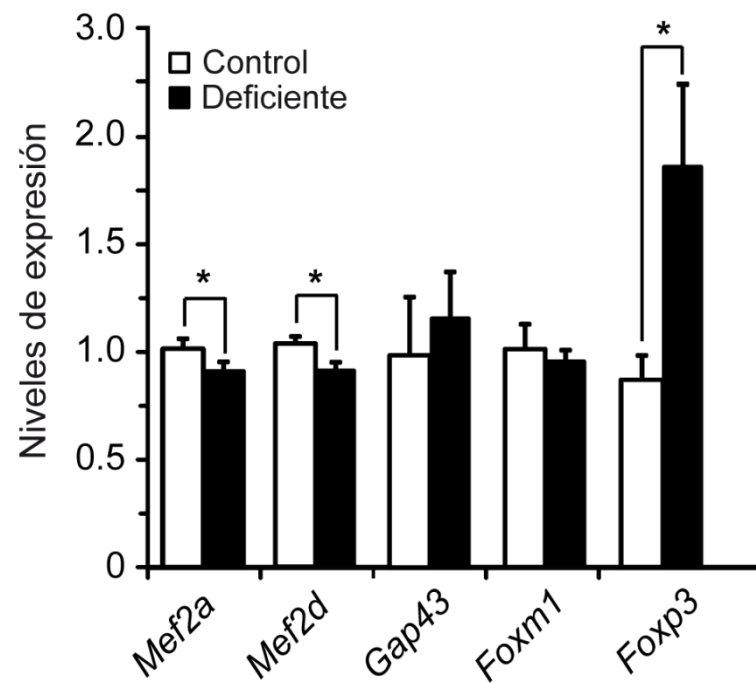


Figura 15. Expresión génica de marcadores cocleares. Niveles de expresión de *Mef2a*, *Mef2d*, *Gap43*, *Foxp3* y *Foxm1* en los grupos control y deficiente empleando los genes *Rn18S* y *Rplp0* como endógenos. Los histogramas muestran las determinaciones realizadas por triplicado para cada muestra animal (Control n=6; Deficiente n=6). Se muestran los valores de media \pm ESM $p < 0,05$ (*).

5. Perfil de expresión de las enzimas del metabolismo de la metionina en la cóclea

Hasta la fecha, la expresión de las enzimas del metabolismo de la metionina en la cóclea únicamente ha sido parcialmente descrita en el ratón mutante para la conexina 30, posteriormente reconocido como mutante para la conexina 26 (Cx30^{-/-} y Cx26^{-/-}; (Cohen-Salmon *et al.*, 2007; Boulay *et al.*, 2013). Por ello, se decidieron llevar a cabo ensayos de RT-qPCR en muestras de cóclea de los animales del grupo control (*Figura 16A*). Tras normalizar los datos con el gen constitutivo *Rn18S*, se pudieron observar diferencias en los niveles de expresión entre algunos de los genes que componen esta ruta. Así, *Mat2a*, *Mat2b*, *Ahcy* y *Adk* fueron los que se expresaron más abundantemente, mientras que se observaron niveles de expresión intermedios para *Bhmt* y *Mtr*, y niveles bajos para *Mal1a*, *Ada*, *Cbs* y *Bhmt2*. Estos resultados indican que la cóclea sigue un patrón de expresión semejante a los tejidos extrahepáticos, exceptuando el caso de los genes *Bhmt* y *Mtr*.

Tras la determinación de los niveles de expresión de ARNm, se llevaron a cabo las medidas mediante *Western blotting* de las proteínas implicadas en el metabolismo de la metionina, mostrando, en su mayoría la movilidad esperada. No obstante, las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-BHMT y anti-AHCY mostraron pesos moleculares de 68 y 58 kDa respectivamente (*Figura 16B-D*), dato que representa un aumento de unos 10-15 kDa en el tamaño de cada proteína en comparación con la banda única que se detecta en torno a 45 kDa en citosoles de células de hepatoma H35 (*Figura 16B-D*). Se forzaron las condiciones de detección en las muestras hepáticas pero no se observaron estas nuevas bandas. Al mismo tiempo, la especificidad de las bandas de BHMT se pudo demostrar mediante la ausencia de señal observada tanto con el suero preinmune de conejo como en los extractos cocleares obtenidos del ratón nulo para *Bhmt*^{-/-}, observándose la presencia de proteína en el carril de control de carga (*Figura 16B-C*) (Teng *et al.*, 2011).

Estos datos manifiestan la existencia de características especiales en las enzimas del ciclo de la metionina en la cóclea.

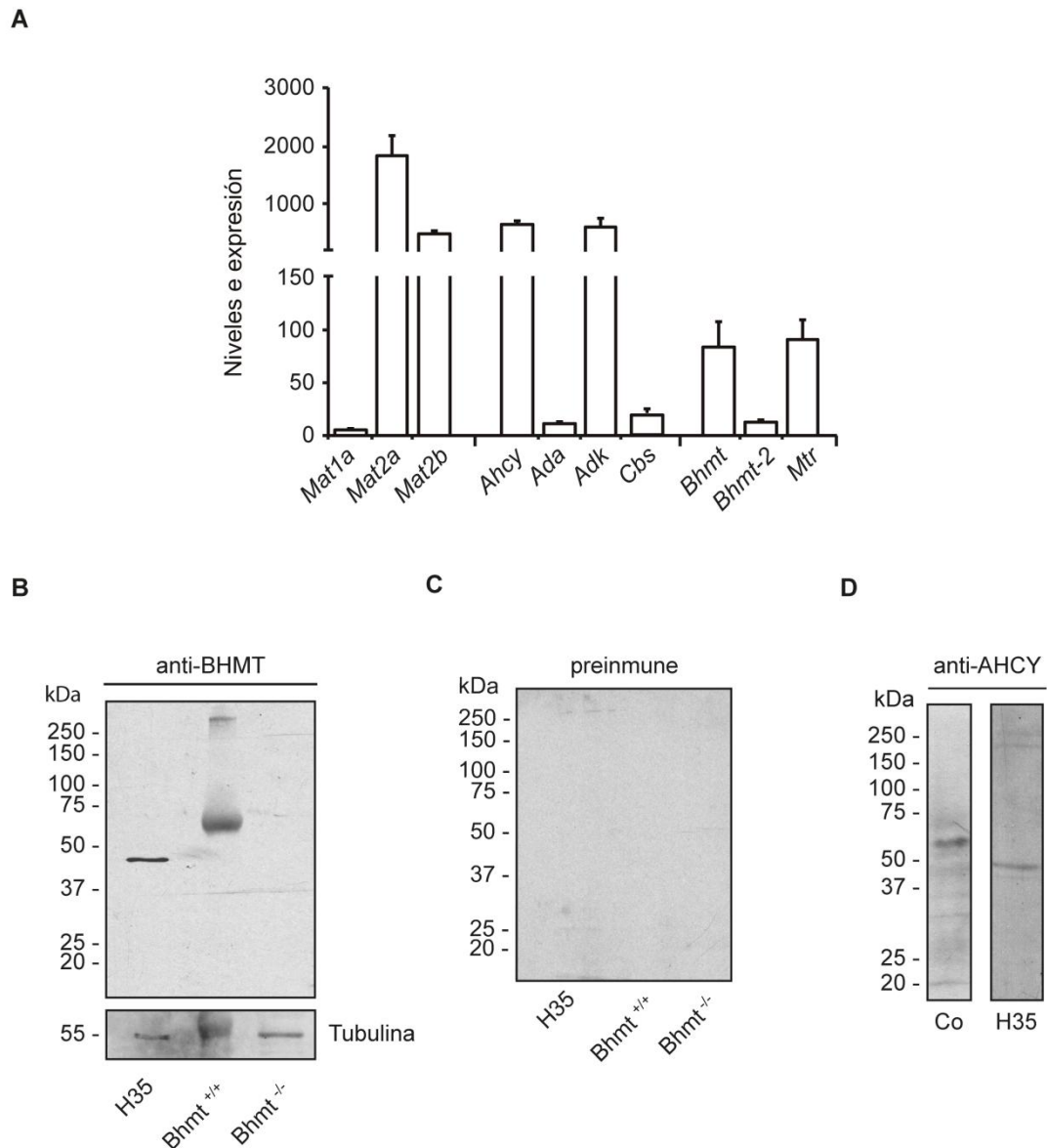


Figura 16. Metabolismo de la metionina en la cóclea en ratones del grupo control. La caracterización del metabolismo de la metionina y reacciones relacionadas se realizó empleando muestras de cóclea de ratones alimentados con una dieta con niveles de folato estándar. **(A)** Los niveles de expresión de ARNm de los genes de interés se determinaron mediante RT-qPCR y se normalizaron los datos mediante el gen de referencia *Rn18s* ($n=6$). **(B-D)**. La verificación mediante *Western blotting* de la especificidad de las bandas, se realizó empleando extractos de proteína total de cócleas de ratones salvajes y nulos para *Bhmt*^{-/-} (200 μ g). Las membranas fueron incubadas con: **(B)** anti-BHMT hecho en conejo (Gonzalez *et al.*, 2003) y anti-tubulina hecha en ratón; **(C)** Suero preinmune; y **(D)** anti-AHCY hecho en cabra (ver *Tabla 3*). Se utilizaron citosoles de células H35 de hepatoma como referencia de la movilidad esperada. Se muestra el tamaño de los marcadores pre-teñidos a la izquierda de las imágenes de las membranas. Co: cóclea.

6. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el ciclo de la metionina en la cóclea a los 4 meses de edad

Dado que los cambios observados en los niveles sistémicos de folato y Hcy podrían reflejar alteraciones en el metabolismo coclear, se decidió realizar ensayos de RT-qPCR en tiempo real (*Figura 17*). El grupo deficiente mostró un descenso en los niveles de expresión de ARNm de un 30-50% en las enzimas implicadas en la producción de Hcy (*Ahcy*) y remetilación (*Bhmt* y *Mtr*) con respecto al grupo control. No obstante, los niveles de ARNm de las enzimas involucradas en la eliminación de productos generados por la AHCY permanecieron sin cambios (*Cbs* y *Adk*) o mostraron una ligera tendencia al aumento (*Ada*; $p=0,08$). No se encontraron alteraciones significativas en los niveles de ARNm de las subunidades de *Mat* ni en los de *Bhmt2*. De este modo, los cambios en la expresión inducidos por el déficit en folato se orientan hacia una disminución en la producción de Hcy y a favorecer su eliminación a través de la vía de la transulfuración y secreción al plasma.

El grupo deficiente mostró alteraciones en los niveles de proteínas de esta ruta con respecto al grupo control. AHCY (58 kDa), CBS (con doble banda correspondiente a las isoformas en ~60-65 kDa), y BHMT (68 kDa) redujeron sus niveles aproximadamente un 40, 70 y 60%, respectivamente (*Figura 18A-C*). Sin embargo, los niveles de MTR (138 kDa) aumentaron significativamente en torno al 70%, así como los de ADA (41 kDa), cuya señal solo pudo ser observada en el grupo deficiente. Los niveles de ADK (41 kDa) permanecieron sin cambios (*Figura 18D-F*).

De nuevo, los resultados obtenidos sugieren la existencia de un esfuerzo por parte del sistema para reducir la producción de Hcy y favorecer su eliminación al plasma. Sin embargo, la combinación de los efectos de la expresión y los niveles de proteína en los ratones deficientes puede no ser suficiente para evitar el aumento de los niveles intracelulares de Hcy. Una consecuencia de este incremento intracelular de Hcy puede ser la homocisteinilación proteica. Se trata de una modificación proteica que puede determinarse mediante *Western blotting* utilizando el anticuerpo anti-HCY y extractos de cóclea completa (*Figura 18G*). Los resultados indican un incremento del 50% en la señal de Hcy unida a proteínas en el grupo deficiente, en comparación con el grupo control, lo cual es indicativo de una hiperhomocisteinemia en la cóclea.

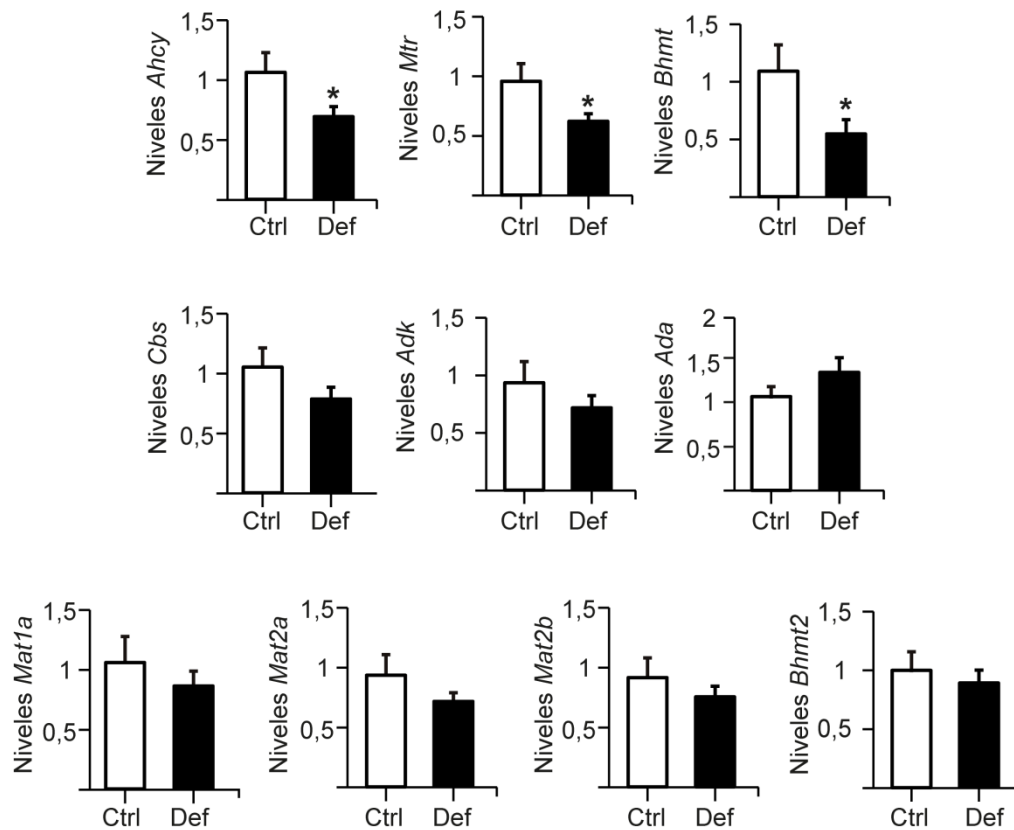


Figura 17. La deficiencia en folato altera la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la metionina a los 4 meses de edad. Los niveles de expresión de los genes de interés se analizaron mediante RT-qPCR en tiempo real con ARN proveniente de las cócleas de animales de los grupos control (n=11) y deficiente (n=12). Se utilizó el gen *Rn18s* como referencia. Se muestran los valores de media \pm ESM. Ctrl: control; Def: deficiente. El análisis de los resultados se realizó mediante una T de Student y estos fueron considerados significativos cuando $p \leq 0,05$ (*).

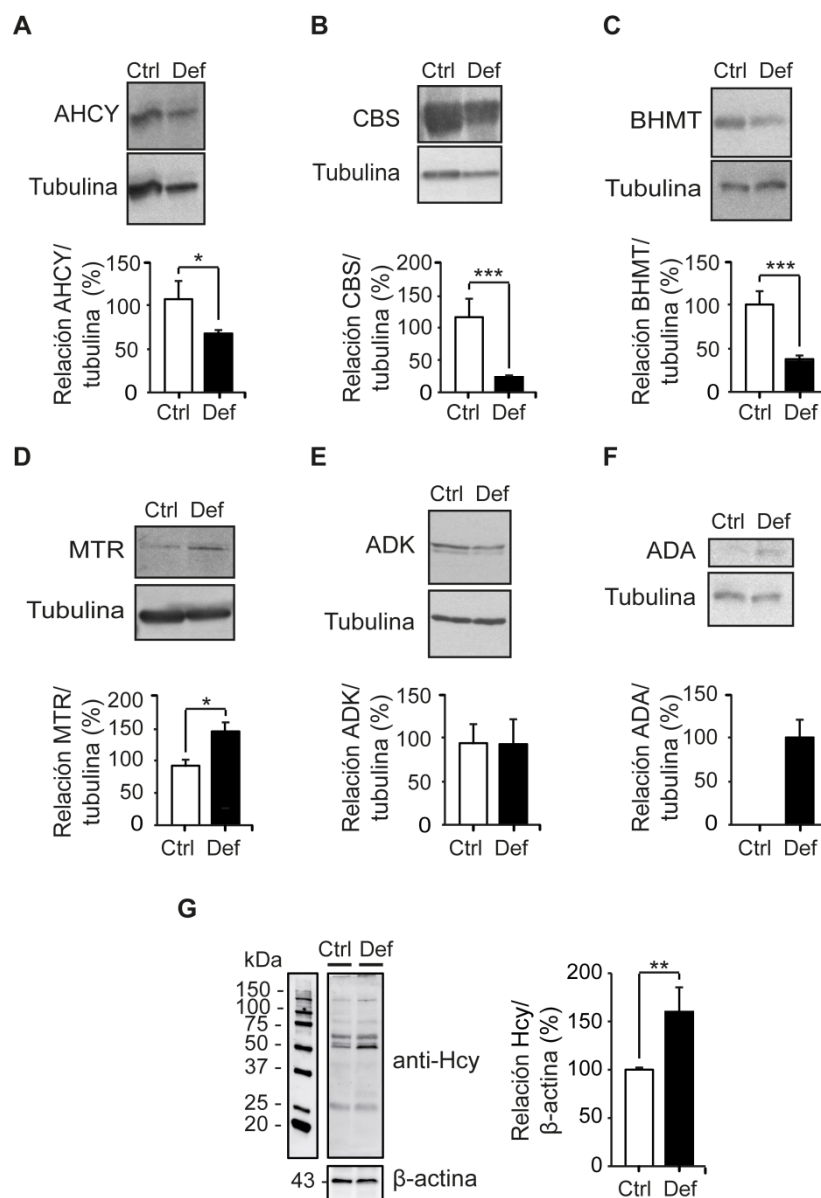


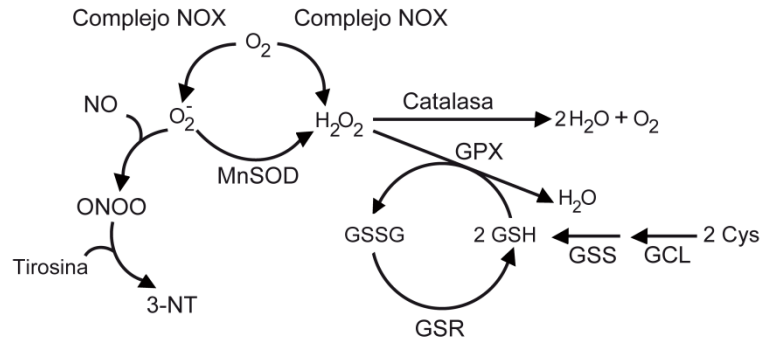
Figura 18. Efectos de la deficiencia en folato en los niveles de proteína de las enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina en la cóclea a los 4 meses de edad. Mediante la técnica de *Western blotting* se analizaron los niveles de proteína total (200 μg /carril) de los animales de los grupos control (n=11) y deficiente (n=20). Se emplearon los siguientes anticuerpos: (A) anti-AHCY; (B) anti-CBS; (C) anti-BHMT; (D) anti-MTR; (E) anti-ADK; and (F) anti-ADA. La figura muestra imágenes representativas para cada anticuerpo junto con las cuantificaciones realizadas con el software ImageJ tras la normalización con tubulina como control de carga. El promedio del grupo control se consideró como el 100% en cada caso con fines gráficos. Se muestran los valores de media \pm ESM. El análisis de los resultados se realizó mediante una T de Student y estos fueron considerados significativos cuando $p \leq 0,05$ (*). (G) Imagen representativa y análisis densitométrico del *Western blotting* de anti-HCY en los grupos control y deficiente. El promedio del grupo control se consideró como el 100%, siendo los valores reales: $3,92 \pm 0,80$ para el grupo control (n=4) y $6,28 \pm 1,06$ para el grupo deficiente (n=5). Ctrl: control; Def: deficiente.

7. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el equilibrio oxidativo de la cóclea a los 4 meses de edad

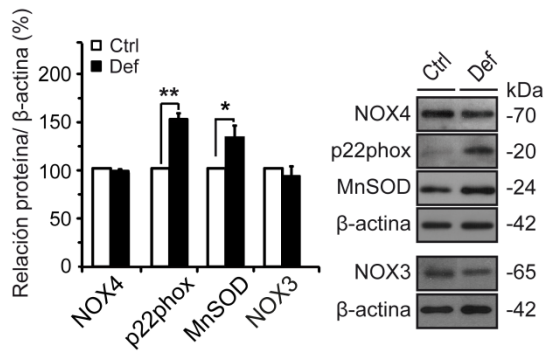
Dado el gran número de estudios que relacionan la pérdida auditiva de diversa índole con el estrés oxidativo (Lautermann *et al.*, 1997; Jacono *et al.*, 1998; Evans & Halliwell, 1999), se decidió estudiar el posible efecto de la dieta deficiente en folato sobre los parámetros de la respuesta oxidativa en la cóclea a nivel celular (*Figura 19A*). Se midieron mediante *Western blotting* los niveles de proteína del complejo oxidativo NADPH (NOX4, NOX3 y p22phox) y de la superóxido dismutasa localizada en el núcleo, MnSOD (*Figura 19B*). Se observaron niveles proteicos similares para NOX4 y NOX3 entre ambos grupos, mientras que se detectó un incremento en los niveles de p22phox (~22 kDa) y MnSOD (~ 20 kDa) de 1,5 y 1,7 veces, respectivamente, en el grupo deficiente con respecto al control.

Además, se midieron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de genes implicados en el control redox de la cóclea (*Figura 19C*). El grupo deficiente mostró niveles disminuidos para los genes *Cat* (20%), *Gpx4* (30%) y *Gss* (15%), mientras que no se apreciaron cambios entre grupos en los niveles de expresión de *Gsr*, *Gpx1* y *Gclc*. Tampoco se observaron cambios entre grupos experimentales en los niveles de expresión *p22phox*, *Nox3* o *Nox4*. Dado que las proteínas GPX requieren la presencia de GSH y generan GSSG, se realizó la detección de los niveles de glutatión. Se detectó un incremento de un 60% en los niveles de GSH y un 50% en los niveles de GSSG en el grupo deficiente con respecto al control, aunque la relación GSH/GSSG no se alteró significativamente ($7,76 \pm 0,36$ vs. $8,49 \pm 0,56$; $p=0,29$; *Figura 19D*). Una consecuencia del metabolismo del estrés nitrosativo es la incorporación de especies reactivas de nitrógeno, como el anión superóxido, a las tirosinas de las proteínas. Esta reacción puede visualizarse mediante inmunohistoquímica con el marcador específico 3-nitrotirosina (3-NT), (*Figura 19E*). Los resultados mostraron un incremento de la señal de 3-NT en la estria vascular y el ganglio coclear en el grupo deficiente a nivel de la media coclear, mientras que los ratones del grupo control presentaron niveles iniciales más bajos.

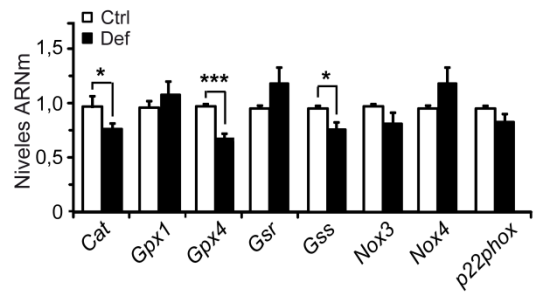
A



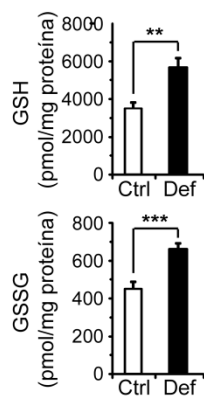
B



C



D



E

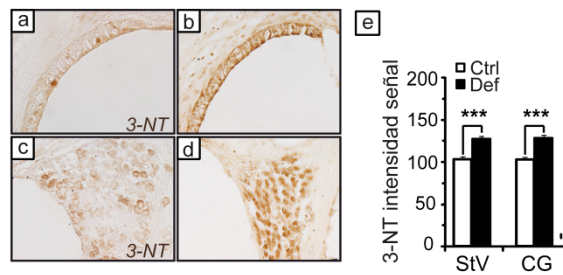


Figura 19. Los ratones deficientes en folato mostraron signos de desequilibrio oxidativo en la cóclea a los 4 meses de edad. (A) Esquema representativo del papel de los marcadores de estrés oxidativo analizados en este modelo. (B) Imágenes representativas de la oxidasa NADPH (NOX4 y NOX3; n=3 control y n=4 deficiente), MnSOD (n=6 control y n=9 deficiente) y p22phox (n=5 control y n=9 deficiente). Los histogramas muestran Los resultados como la media \pm ESM tras la normalización con β -actina. (C) Resultado del estudio de los niveles de expresión de ARNm de *Cat*, *Gpx1*, *GPx4*, *Gsr*, *Gclc* y *Gss* mediante RT-qPCR en tiempo real con *Rplp0* como gen de referencia. (D) Estudio de los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH; n=6 ratones por grupo). (E) Imágenes representativas de los niveles de 3-NT detectados mediante inmunohistoquímica en la estría vascular (StV; a,b) y el ganglio (CG; c,d) de los ratones de los grupos control (a,c; n=3) y deficiente (b,d; n=6). (e) Los histogramas muestran la cuantificación de la señal de 3-NT como media \pm ESM. Ctrl: control; Def: deficiente. El análisis de los resultados se realizó mediante una T de Student; $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Barra de escala: 25 μ m.

II. Estudio del efecto de la dieta deficiente en ácido fólico en ratones CBA

1. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el peso a los 10 meses de edad

Los animales que recibieron la dieta deficiente en ácido fólico mostraron una ganancia de peso final menor con respecto al grupo control, resultando significativa a los 9 y 10 meses de edad ($p < 0,01$; *Figura 20A*). Pese a ello, el consumo de la dieta fue similar entre ambos grupos a lo largo de todo el experimento (*Figura 20B*). Tanto la ingesta como la ganancia de peso se mantuvieron por encima del límite de normalidad para la estirpe en ambos grupos, según los estándares publicados en los laboratorios Jackson (línea de referencia en *Figura 20A*; <http://jaxmice.jax.org/support/weight/000656>).

2. Efecto del déficit en ácido fólico sobre los niveles de homocisteína y folato a los 10 meses de edad

Para comprobar que las dietas suministradas causaron variaciones en los niveles sanguíneos de Hcy y folato, se analizaron estos marcadores en plasma y suero al comienzo y al final del experimento. No se observaron diferencias en los niveles de folato en el momento inicial entre los diferentes grupos (*Figura 21*). A los 10 meses de edad, se observó un descenso del folato y un aumento en los niveles de Hcy en plasma muy significativos ($p < 0,001$) en el grupo deficiente con respecto al grupo control (*Figura 21*).

Estos datos demuestran que la administración de una dieta deficiente en folato provocó un descenso sistémico de sus niveles (unas 7 veces) así como una hiperhomocisteinemia (aumento de 5 veces).

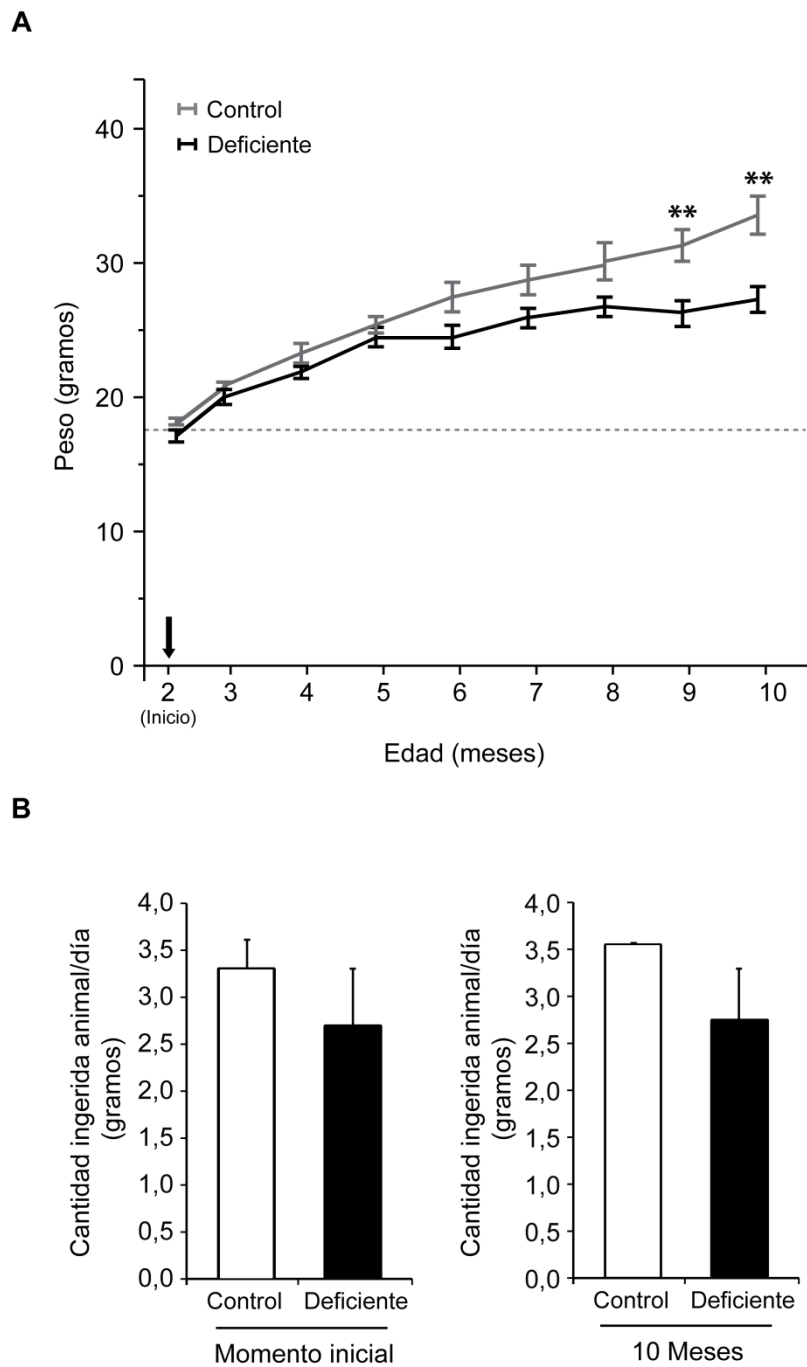


Figura 20. A. Evolución del peso en función de la dieta a lo largo de todo el experimento. La línea discontinua establece el límite mínimo de peso normal para la estirpe según lo establecido por los Laboratorios Jackson. La fecha negra indica el momento del inicio de la dieta. **B. Cantidad de pienso ingerida en los grupos control y deficiente para los momentos inicial y 10 meses de edad.** Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $p < 0,01$ (**).

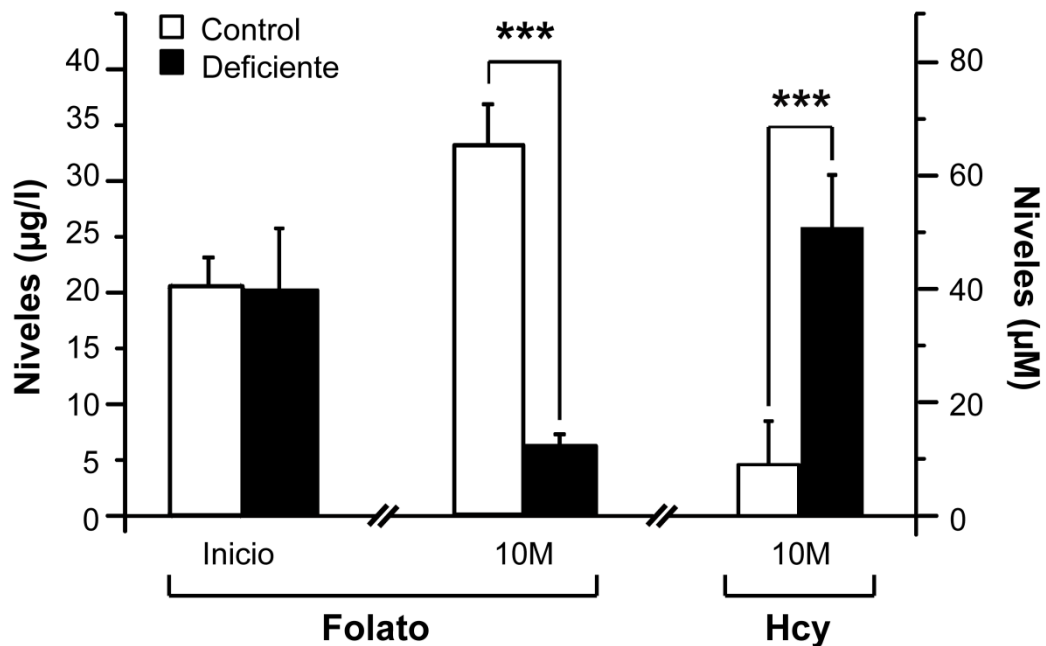


Figura 21. Niveles de folato y Hcy de las ratonas CBA alimentadas con dieta control y deficiente en ácido fólico a los 10 meses de edad. No se observaron diferencias en los niveles de folato al comienzo del experimento [$19,98 \pm 5,57$ frente a $20,45 \pm 2,59$ µg/l]. A los 10 meses de edad, se observó un marcado descenso de los niveles de folato [$6,25 \pm 0,98$ frente a $32,82 \pm 3,53$ ng/ml] y niveles muy elevados de Hcy [$50,71 \pm 4,20$ frente a $7,07 \pm 0,89$ µM] en el grupo deficiente con respecto al grupo control. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $p < 0,001$ (***).

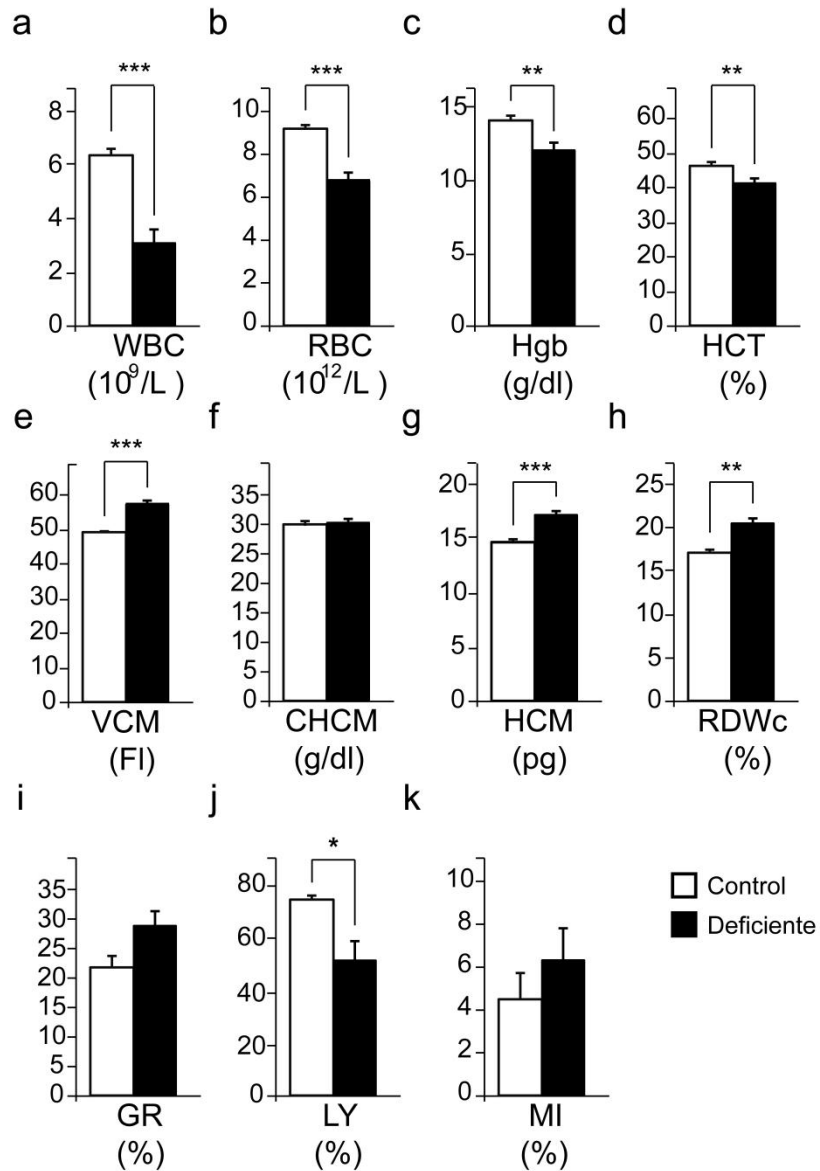
3. Efecto del déficit en ácido fólico sobre el perfil hematológico a los 10 meses de edad

El déficit prolongado en ácido fólico o vitamina B12 en la dieta lleva a la aparición de una anemia de tipo megaloblástica (Cox *et al.*, 1961; Bailey & Caudill, 2013). Así, el déficit prolongado de ácido fólico en las ratonas del grupo deficiente provocó un descenso en los niveles de hemoglobina normales (Hgb), de los glóbulos rojos y blancos (RBC y WBC), del porcentaje de linfocitos (LY) y del hematocrito (HTC; *Figura 22A*, paneles *a-d, j*). Además, se observó un aumento del volumen corpuscular medio (VCM), del grado de anisocitosis (RDWc) y de la hemoglobina corpuscular media (HCM). Los niveles de concentración de hemoglobina corpuscular media por hematíe (CHCM), de granulocitos (GR) y de células de rango medio (MI) permanecieron normales (*Figura 22A*, paneles *e-i, k*).

Se realizó un análisis de extensiones de sangre periférica (n=5 animales con 3 extensiones por animal) así como extensiones y secciones de médula ósea (n=3 ratonas por) con el fin de corroborar estos resultados. Se apreció un descenso marcado en la presencia de megacariocitos y una menor diferenciación con menor lobulación del núcleo en la médula ósea, así como un volumen citoplasmático reducido (*Figura 3B*, paneles *a y b* comparados con *c y d*). Por su parte, en sangre periférica pudieron observarse polimorfonucleares neutrófilos hipersegmentados (dado el descenso en su producción), así como una marcada anisocitosis y presencia de cuerpos de Howell-Jolly (*Figura 22B*, paneles *f-i*).

Estos resultados demuestran que el déficit nutricional en ácido fólico provocó la aparición de una anemia de tipo megaloblástica en los animales del grupo alimentado con dieta deficiente en folato a los 10 meses de edad.

A



B

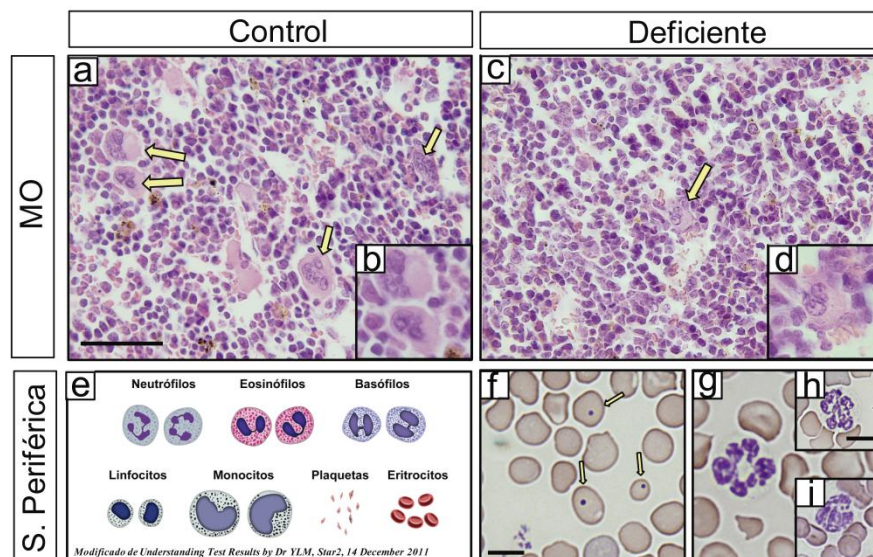


Figura 22. (A) Perfil hematológico de las ratonas CBA alimentadas con dieta control y deficiente en ácido fólico a los 10 meses de edad. Se observa un descenso significativo en los glóbulos blancos, glóbulos rojos, hematocrito y linfocitos (paneles a-d, j) y un aumento en el volumen corpuscular medio, promedio de hemoglobina por hematíe y el índice de distribución de glóbulos rojos (e, g, h) en el grupo deficiente con respecto al control. WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos, Hgb: hemoglobina; HCT: Hematocrito; VCM: volumen corpuscular medio; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media por hematíe; HCM: hemoglobina corpuscular media (picogramos), RDWc: índice de distribución de glóbulos rojos; GR: granulocitos; LY: linfocitos; MI: células de rango medio. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. **(B) Imágenes de médula ósea (a-d) y sangre periférica (f-i) de las ratonas CBA alimentadas con dieta control y deficiente en ácido fólico a los 10 meses de edad.** Las ratonas deficientes en ácido fólico muestran una reducción del número de megacariocitos en médula ósea (flechas amarillas) y una menor diferenciación con menor lobulación del núcleo (a-d). Esquema del aspecto normal de la serie blanca y los eritrocitos (e). Presencia de anisocitosis y cuerpos de Howell-Jolly (flechas amarillas en f) y polimorfonucleares neutrófilos hipersegmentados (g-i) en sangre periférica. MO: médula ósea, S. Periférica: sangre periférica. a, b, d, e: hematoxilina-eosina; f-i: tinción de Wright. Barra de escala: 50 μm (a, c); 25 μm (b, d); 10 μm resto.

4. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la función auditiva a los 10 meses de edad

Se realizaron pruebas funcionales de ABR dos veces durante el primer mes, y una vez al mes durante el resto del experimento. Los resultados se muestran en la *Tabla 9* y la *Figura 23*. Debido a la similitud de los datos durante estas mediciones, solo se muestran tres momentos concretos del estudio en los gráficos: el momento inicial previo al comienzo de la dieta (Inicio), un momento intermedio (7 meses de edad) y el momento final (10 meses de edad). En aquellos animales utilizados para realizar pruebas de productos de distorsión de emisiones otoacústicas (DPOAE), dada la larga duración de la prueba, se obtuvieron solamente valores para los umbrales auditivos tipo click y tonos puros de 8, 20 y 40 kHz en ABR.

No se observaron diferencias en los valores de latencias, latencias interpico y amplitudes entre los dos grupos para ninguno de los momentos estudiados (*Tablas 9-11*, *Figura 23*). Se observó en ambos grupos un descenso en la amplitud de la onda I a los 10 meses de edad, que coincidió con un ligero aumento de los umbrales auditivos y con la caída del órgano de Corti en la base coclear a nivel histológico (ver *Figura 23*; ver punto 5). Nos encontramos por tanto frente al inicio de la pérdida auditiva en los animales de ambos grupos.

El estudio de los DPOAE se centró en el análisis de las características de la componente $2f1-f2$ tras estimulación con los tonos puros correspondientes a las frecuencias de 8, 10, 14, 18 y 22 kHz. Todos los animales analizados presentaron componente $2f1-f2$ tras estimulación con los mismos. En la *Tabla 12* y la *Figura 24* se representa el umbral de aparición del producto de distorsión para las frecuencias de 8, 10, 14, 18 y 22 kHz, es decir, la mínima intensidad de estimulación ($L1=L2$) con la que se obtiene una componente $2f1-f2$ claramente distinguible del ruido de fondo. En ellas puede observarse cómo las ratonas deficientes en ácido fólico presentan un DPOAE-grama desplazado con respecto a los respectivos controles. El análisis estadístico de los datos reflejó una diferencia significativa en las frecuencias de 8 y 10 kHz al final del estudio (*Figura 24A*). Al mismo tiempo, se observó un descenso en la amplitud de la componente $2f1-f2$ en el grupo deficiente con respecto al control siendo significativamente diferente para la frecuencia de estimulación de 10 kHz (*Tabla 13* y *Figura 24B*; $p<0,05$).

Estos datos muestran la existencia de una pérdida prematura de la función auditiva como consecuencia del déficit en ácido fólico.

	Umbral ABR (dB SPL)					
	Edad (meses)					
	2 (Inicio)		7		10	
	Control	Deficiente	Control	Deficiente	Control	Deficiente
n	9	10	9	9	9	5
Test						
Click	16 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	18 ± 1	24 ± 1	24 ± 3
8 kHz	22 ± 1	25 ± 0	23 ± 1	23 ± 1	44 ± 4	43 ± 1
16 kHz	21 ± 1	25 ± 2	24 ± 1	25 ± 0	43 ± 5	43 ± 3
20 kHz	21 ± 1	25 ± 0	29 ± 2	27 ± 1	43 ± 2	41 ± 1
28 kHz	23 ± 1	27 ± 1	28 ± 1	28 ± 1	40 ± 2	39 ± 1
40 kHz	28 ± 1	30 ± 2	32 ± 1	29 ± 1	39 ± 2	38 ± 1

Tabla 9. Promedio de los umbrales ABR para click y tonos puros de 8, 16, 20, 28 y 40 kHz (dB SPL), para los grupos control y deficiente en los momentos: inicio, 7 y 10 meses de edad. No se observaron diferencias entre ambos grupos. Se muestra la media ± ESM.

	Latencia ABR (ms)					
	Edad (meses)					
	2 (Inicio)		7		10	
	Control	Deficiente	Control	Deficiente	Control	Deficiente
n	9	10	9	9	9	5
Onda I	1,42 ± 0,01	1,33 ± 0,02	1,29 ± 0,04	1,35 ± 0,02	1,39 ± 0,02	1,34 ± 0,04
Onda II	2,42 ± 0,03	2,36 ± 0,02	2,18 ± 0,04	2,31 ± 0,02	2,36 ± 0,03	2,31 ± 0,07
Onda III	3,17 ± 0,04	2,99 ± 0,05	2,87 ± 0,06	2,97 ± 0,03	3,17 ± 0,06	3,2 ± 0,09
Onda IV	4,07 ± 0,03	3,93 ± 0,04	3,9 ± 0,05	3,93 ± 0,02	4,06 ± 0,03	3,99 ± 0,04
I-II	1,00 ± 0,02	1,02 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,96 ± 0,01	0,97 ± 0,02	0,97 ± 0,03
I-IV	2,65 ± 0,03	2,6 ± 0,03	2,61 ± 0,03	2,58 ± 0,02	2,68 ± 0,02	2,65 ± 0,03
II-IV	1,65 ± 0,02	1,57 ± 0,02	1,72 ± 0,02	1,62 ± 0,02	1,7 ± 0,02	1,68 ± 0,05

Tabla 10. Latencias pico (PL, en ms) e interpico (IPL en ms) por grupo experimental y momento de estudio, estadísticos descriptivos. No se observaron diferencias entre ambos grupos. Se muestra la media ± ESM.

Amplitud ABR (nV)						
Edad (meses)						
2 (Inicio)		7		10		
	Control	Deficiente	Control	Deficiente	Control	Deficiente
n	9	10	9	9	9	5
Onda I	857 ± 88	729 ± 95	869 ± 217	835 ± 44	553 ± 39	424 ± 57
Onda II	1474 ± 153	1285 ± 128	922 ± 147	1035 ± 73	961 ± 79	964 ± 90
Onda III	150 ± 44	188 ± 52	278 ± 66	288 ± 65	192 ± 35	224 ± 60
Onda IV	1278 ± 175	1105 ± 104	1227 ± 210	1449 ± 106	746 ± 94	797 ± 129

Tabla 11. Amplitudes de las ondas I a IV (nV) por grupo experimental y momento de estudio; estadísticos descriptivos. No se observaron diferencias entre ambos grupos. Se muestra la media ± ESM.

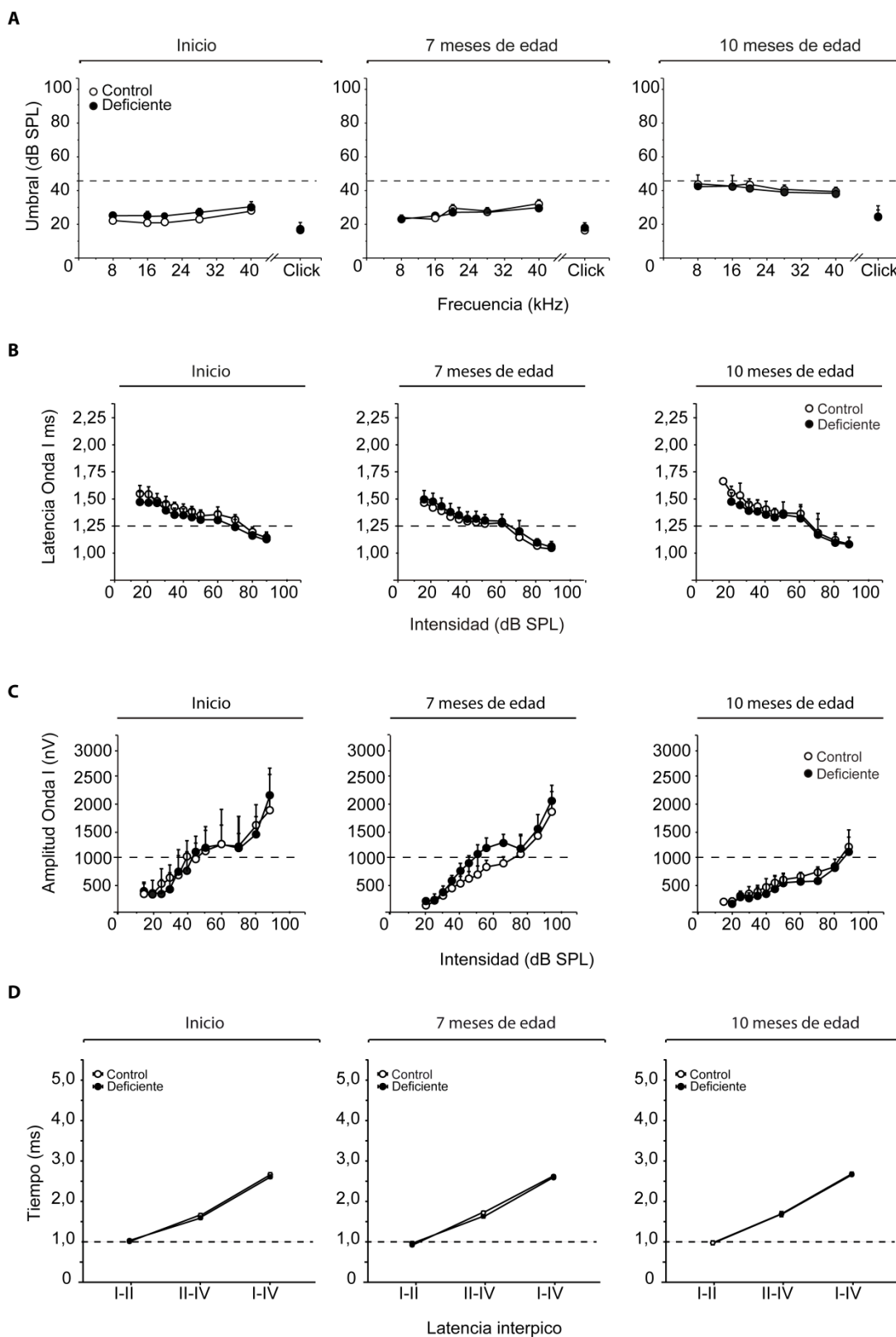


Figura 23. (A) Gráficos de los promedios de umbrales ABR para click y tonos puros de 8, 16, 20, 28 y 40 kHz (dB SPL), latencias y amplitudes para los momentos: inicial, 7 y 10 meses de edad de los grupos control y deficiente en ácido fólico. La línea de referencia muestra el límite de la normo-audición (45 dB SPL). (B) Pendiente de latencia-intensidad (ms/dB SPL) de la onda I en los 3 momentos previamente descritos. (C) Pendiente de amplitud-intensidad (nV/dB SPL) para la onda I en los individuos de los dos grupos analizados en los momentos inicial, 7 y 10 meses de edad. Líneas de referencia en eje Y: 1,25 ms y 1000 nV, respectivamente. (D) Latencias interpico (ms) promedio para ambos grupos en los momentos: inicial, 7 y 10 meses de edad. Líneas de referencia en eje Y: 1 ms. No se observaron diferencias significativas. Se muestra la media \pm ESM.

n	Umbral DP (dB SPL)					
	Edad (meses)					
	2 (Inicio)		7		10	
	Control	Deficiente	Control	Deficiente	Control	Deficiente
	4	5	4	5	4	3
Test						
8 kHz	39 ± 4	37 ± 3	35 ± 5	37 ± 3	32 ± 2	55 ± 6
10 kHz	36 ± 4	33 ± 3	42 ± 2	40 ± 0	32 ± 2	50 ± 0
14 kHz	42 ± 3	45 ± 5	45 ± 3	42 ± 2	40 ± 0	57 ± 10
18 kHz	50 ± 4	59 ± 0	52 ± 4	48 ± 2	52 ± 2	75 ± 9
22 kHz	63 ± 4	60 ± 10	62 ± 2	60 ± 0	57 ± 3	75 ± 9

Tabla 12. Umbrales DP de la componente $2f_1-f_2$ tras estimulación con tonos puros correspondientes a las frecuencias centrales 8, 10, 14, 18 y 22 kHz.

n	Amplitud $2f_1-f_2$ (dB SPL)					
	Edad (meses)					
	2 (Inicio)		7		10	
	Control	Deficiente	Control	Deficiente	Control	Deficiente
	5	3	3	3	5	4
Test						
8 kHz	79 ± 4	84 ± 4	82 ± 3	79 ± 1	78 ± 4	72 ± 3
10 kHz	79 ± 5	79 ± 4	79 ± 5	79 ± 2	81 ± 1	60 ± 5
14 kHz	88 ± 3	89 ± 1	89 ± 0	87 ± 2	78 ± 3	70 ± 5
18 kHz	87 ± 4	89 ± 2	89 ± 1	86 ± 5	86 ± 4	82 ± 0
22 kHz	79 ± 2	78 ± 1	75 ± 0	75 ± 1	77 ± 3	79 ± 0

Tabla 13. Amplitud de la componente $2f_1-f_2$ de los DPOAE tras estimulación con tonos puros correspondientes a las frecuencias centrales 8, 10, 14, 18 y 22 kHz.

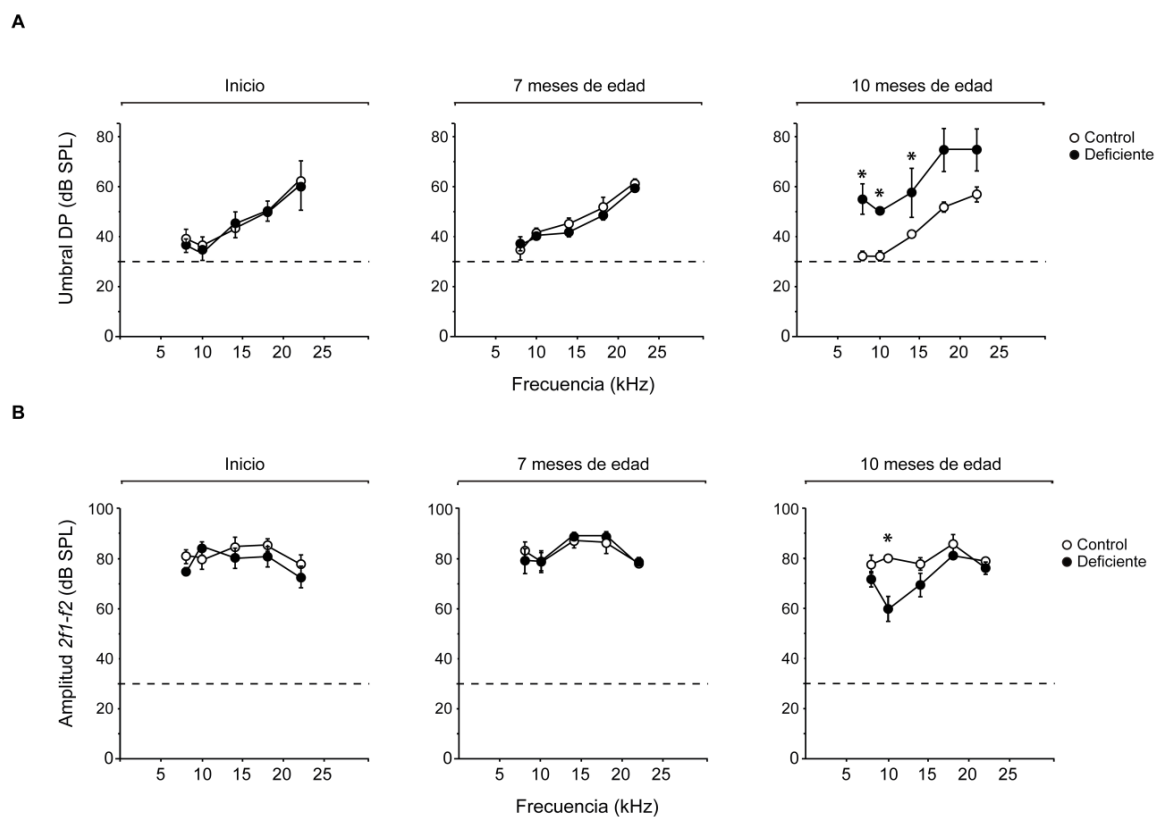


Fig. 24. (A) Intensidad mínima de los tonos primarios (en dB SPL) que generan una componente $2f1-f2$ para ambos grupos en los momentos: inicial, 7 y 10 meses de edad. Los ratones deficientes en ácido fólico mostraron un ligero empeoramiento de los umbrales DPOAE a los 10 meses de edad para todas las frecuencias estudiadas, resultando significativamente distinto en las mediciones a 8, 10 y 14 kHz con respecto al grupo control. (B) Amplitud de la componente $2f1-f2$ para ambos grupos en los momentos: inicial, 7 y 10 meses de edad. La amplitud se analizó a una intensidad de 20 dB por encima del umbral auditivo. Se observó un descenso de la amplitud en el grupo deficiente con respecto al control en los tonos de 8, 10 y 14 kHz, siendo significativo en el tono de 10 kHz ($p < 0,05$). Líneas de referencia en eje Y: 30 dB SPL. Se muestra la media \pm ESM y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$; $p < 0,05$ (*).

5. Efecto del déficit en ácido fólico sobre la morfología coclear a los 10 meses de edad

Al final del experimento, se tomaron muestras de cóclea para llevar a cabo el análisis histológico. La *Figura 25* muestra los resultados obtenidos para los grupos de las ratonas CBA control y deficientes en ácido fólico (*Figura 25*, paneles *A-I*). Dado que la media y ápex cocleares permanecieron sin cambios morfológicos evidentes, solo se muestran imágenes de la base coclear. Ambos grupos mostraron una caída del túnel de Corti junto con una pérdida de algunas células del órgano de Corti (*Figura 25* paneles *B* y *G*). Además, se observó una acumulación de melanina en forma de gránulos en la estría vascular (*Figura 25*, paneles *C* y *H*) y una leve pérdida de los fibrocitos tipo IV del ligamento espiral (*Figura 25*, paneles *D* e *I*).

No se observaron diferencias morfológicas evidentes entre los animales de los grupos control y deficiente a los 10 meses de edad.

Los ratones de la estirpe CBA/Ca son conocidos por presentar una aparición tardía de la pérdida auditiva que comienza entre los 12-18 meses de edad (Li & Borg, 1991). Por este motivo, las alteraciones morfológicas y la pérdida auditiva observadas, tanto en las ratonas alimentadas con dieta deficiente como las mantenidas con una dieta control, fue mínima en comparación con el momento inicial.

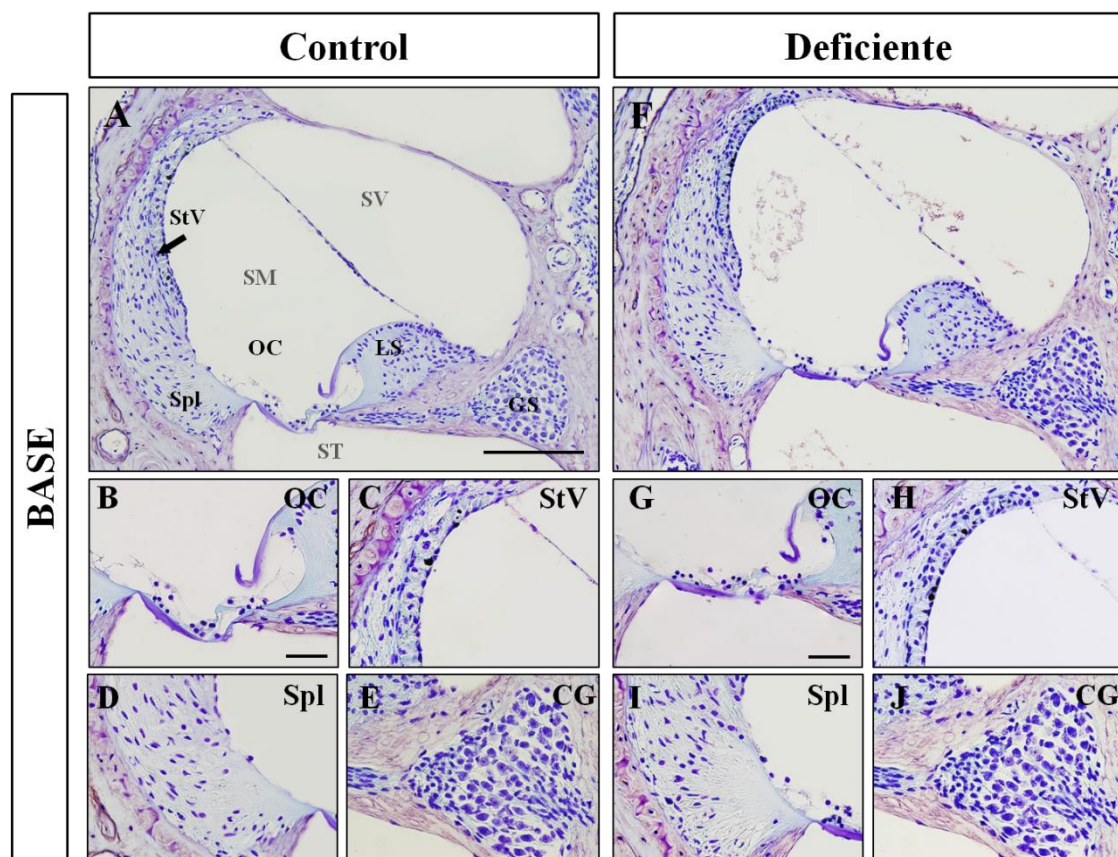


Fig. 25. Detalle de la base coclear de las ratonas control (A-E) y alimentadas con dieta deficiente en ácido fólico (F-J) a los 10 meses de edad. Se observa una caída del órgano de Corti (B, G) y una ligera pérdida de fibrocitos tipo IV en el ligamento espiral (D, I) en ambos grupos. Se observan también gránulos de melanina en la estría vascular de ambos grupos (C, H). La densidad neuronal permaneció inalterada tanto en el grupo control como en el grupo deficiente en ácido fólico. SV: escala vestibular, ST: escala timpánica, SM: escala media, Spl: ligamento espiral, StV: estría vascular, OC: órgano de Corti, LS: limbo espiral, CG: ganglio coclear. Tinción de Nissl. Barra de escala: 150 μm (A, F); 25 μm , resto.

III. Estudio del efecto de la dieta suplementada con ácidos grasos omega-3 en ratones C57

1. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre el peso a los 10 meses de edad

La ganancia de peso fue similar a lo largo de todo el experimento entre ambos grupos (*Figura 26A*) tanto al inicio del estudio (Control $17,1 \pm 0,2$ g vs omega-3 $16,4 \pm 0,2$ g.; $p > 0,05$) como al final (Control $24,6 \pm 0,9$ g vs omega-3 $23,3 \pm 0,6$ g; $p > 0,05$). El consumo medio diario (*Figura 26B*) difirió significativamente durante las primeras semanas entre los grupos estudiados (Control $4,70 \pm 0,11$ g. vs omega-3 $4,12 \pm 0,11$ g.; $p = 0,03$). Sin embargo, al final del tratamiento la ingesta resultó similar entre los mismos (Control $4,80 \pm 0,04$ g. vs omega-3 $4,52 \pm 0,15$ g.; $p > 0,05$). Tanto la ingesta como la ganancia de peso se mantuvieron en todo momento por encima del límite de normalidad según los estándares publicados en los laboratorios Jackson (línea de referencia en *Figura 26A*; <http://jaxmice.jax.org/support/weight/000664>).

2. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre los niveles de homocisteína y folato a los 10 meses de edad

Dada la relación descrita entre los ácidos grasos omega-3 y los niveles de Hcy y/o folato en algunos estudios epidemiológicos (Huang *et al.*, 2011), estos parámetros fueron determinados en plasma y suero, respectivamente (*Figura 27*). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p > 0,05$).

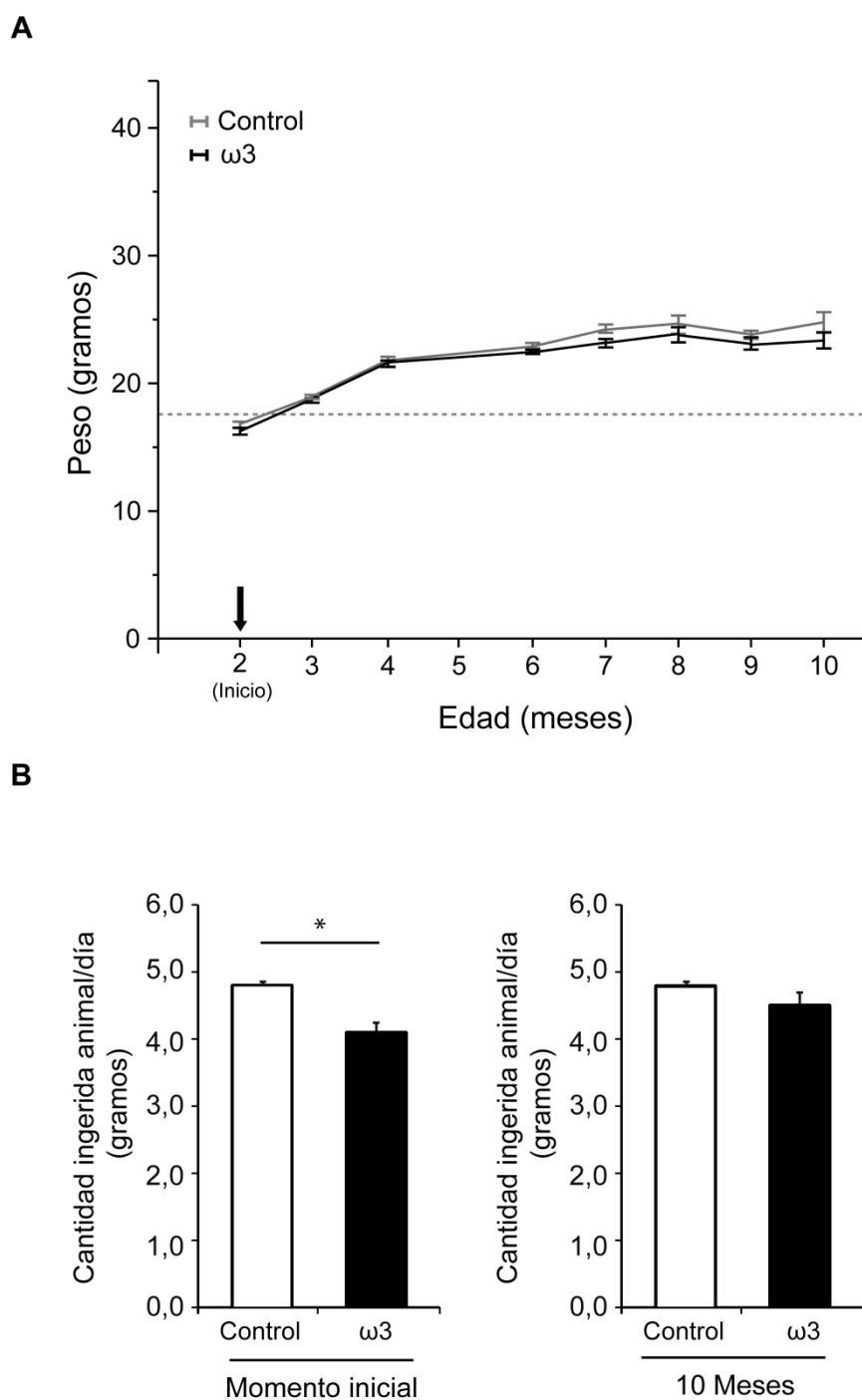


Figura 26. Evolución del peso y niveles de ingesta de los animales de los grupos control y omega-3 a lo largo del experimento. **A.** Evolución del peso en función de la dieta a lo largo de todo el experimento. La línea discontinua establece el límite mínimo de peso normal para la estirpe según lo establecido por los Laboratorios Jackson. La fecha negra indica el momento del inicio de la dieta. **B.** Cantidad de pienso ingerido en los grupos control y omega-3 para los momentos inicial (2 meses) y 10 meses de edad. $\omega 3$: omega-3. Se muestra la media \pm ESM.

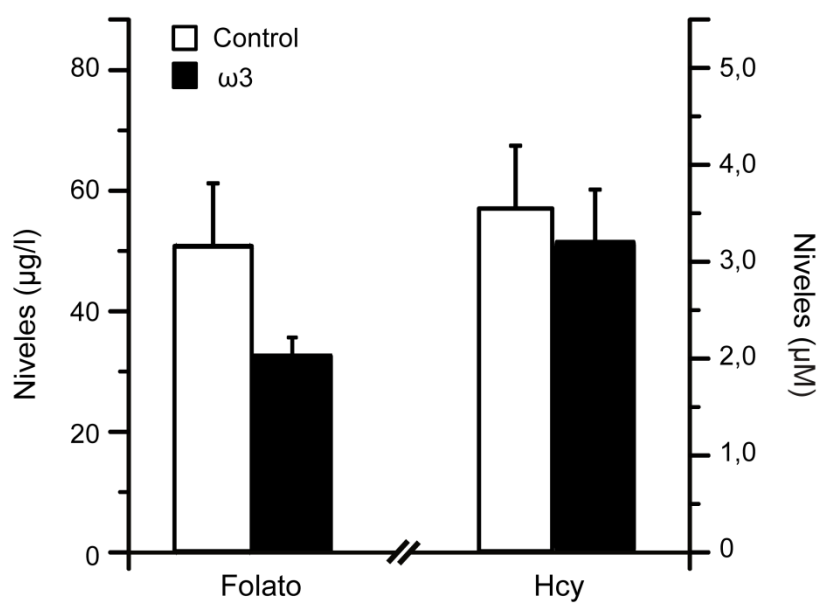


Figura 27. Niveles sistémicos de Hcy y folato. Se muestran los niveles de metabolitos en plasma y suero de los ratones suplementados con omega-3 y sus respectivos controles los 10 meses de edad. Folato en suero [$50,56 \pm 10,66$ (n=5) vs. $32,67 \pm 3,14$ µg/l (n=6)] y tHcy [$3,56 \pm 0,62$ (n=5) vs $3,22 \pm 0,53$ µM (n=6)]. *ω3*: omega-3. Se muestran los valores de media ± ESM de al menos 3 animales por condición.

3. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre la función auditiva a los 7 y 10 meses de edad

El estudio de la función auditiva se realizó a los 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 meses de edad. Dada la similitud entre los grupos hasta los 6 meses, se muestran únicamente los resultados más relevantes del estudio, esto es, para los momentos inicial, 7 y 10 meses de edad. No hubo diferencias entre los grupos al comienzo del estudio (audiogramas en *Figuras 28A y 29A*).

A los 7 meses de edad, los resultados de umbrales ABR, latencias y amplitudes fueron similares entre los grupos control y suplementado con omega-3 (*Tablas 14 a 16 y Figura 28A*). No se observaron diferencias en los umbrales DP a esta edad (*Tabla 17 y Figura 28B*). Ahora bien, el estudio de los DPOAE en el grupo control, mostró la existencia de un descenso significativo en la amplitud de la componente $2f_1-f_2$ para la frecuencia de 8 kHz, a una intensidad fija de 80 dB SPL, con respecto al grupo omega-3 (*Tabla 18 y Figura 28B*).

A los 10 meses, el daño observado correspondiente a la pérdida de las células ciliadas externas, pudo observarse también en el ABR, donde el grupo control mostró un incremento en los umbrales auditivos para todas las frecuencias estudiadas (*Tablas 14 a 16 y Figura 29A*). Así, se observó un aumento significativo de los umbrales auditivos en respuesta a las frecuencias de 4, 8 y 40 kHz, de 27, 16 y 17 dB SPL, respectivamente ($p < 0,001$, $p = 0,026$ y $p = 0,027$) para el grupo control con respecto al grupo suplementado (*Figura 29A*). Aunque los valores de las latencias pico e interpico fueron similares entre los grupos a esta edad, el grupo control mostró un retardo mantenido en la latencia de la onda IV con respecto al grupo suplementado con omega-3 (*Figura 29B y C*).

Estos datos indican que la suplementación con omega-3 ralentiza la progresión de la sordera neurosensorial.

	Umbral ABR (dB SPL)					
	Edad (meses)					
	2 (Inicio)		7		10	
	Control	Omega-3	Control	Omega-3	Control	Omega-3
n	8	9	8	9	5	6
Test						
Click	23 ± 3	22 ± 2	31 ± 2	31 ± 2	72 ± 10	62 ± 4
4 kHz	21 ± 1	20 ± 0	43 ± 3	43 ± 3	78 ± 2	55 ± 3
8 kHz	21 ± 1	20 ± 0	39 ± 2	42 ± 2	74 ± 4	58 ± 2
16 kHz	23 ± 1	21 ± 1	49 ± 2	55 ± 5	80 ± 0	75 ± 2
20 kHz	24 ± 2	22 ± 2	55 ± 2	56 ± 2	80 ± 0	78 ± 2
28 kHz	29 ± 2	25 ± 1	52 ± 2	56 ± 3	83 ± 3	78 ± 2
40 kHz	39 ± 2	36 ± 1	55 ± 3	59 ± 3	88 ± 5	78 ± 2

Tabla 14. Promedio de los umbrales ABR para click y tonos puros de 4, 8, 16, 20, 28 y 40 kHz (dB SPL), para los grupos control y suplementado con omega-3 en los momentos inicial, 7 y 10 meses de edad. No se observaron diferencias entre ambos grupos. Se muestra la media ± ESM.

	Latencia ABR (ms)					
	Edad (meses)					
	2 (Inicio)		7		10	
	Control	Omega-3	Control	Omega-3	Control	Omega-3
n	8	9	8	9	5	6
Onda I	2,58 ± 0,15	2,66 ± 0,06	2,54 ± 0,05	2,69 ± 0,05	2,50 ± 0,09	2,51 ± 0,05
Onda II	1,57 ± 0,08	1,66 ± 0,07	1,61 ± 0,02	1,75 ± 0,03	1,61 ± 0,08	1,62 ± 0,05
Onda III	3,47 ± 0,09	3,61 ± 0,05	3,51 ± 0,11	3,57 ± 0,06	3,29 ± 0,10	3,45 ± 0,11
Onda IV	4,37 ± 0,07	4,44 ± 0,06	4,41 ± 0,12	4,43 ± 0,04	4,28 ± 0,09	4,24 ± 0,06
I-II	1,02 ± 0,06	1,00 ± 0,02	0,93 ± 0,04	0,94 ± 0,03	0,89 ± 0,03	0,88 ± 0,06
I-IV	2,87 ± 0,11	2,86 ± 0,05	2,80 ± 0,12	2,78 ± 0,05	2,82 ± 0,11	2,80 ± 0,10
II-IV	1,87 ± 0,10	1,86 ± 0,06	1,87 ± 0,08	1,83 ± 0,06	1,88 ± 0,10	1,82 ± 0,04

Tabla 15. Latencias pico (PL, en ms) e interpico (IPL en ms) por grupo experimental y momento de estudio, estadísticos descriptivos. No se observaron diferencias entre ambos grupos. Se muestra la media ± ESM.

Amplitud ABR (nV)						
Edad (meses)						
2 (Inicio)		7		10		
	Control	Omega-3	Control	Omega-3	Control	Omega-3
n	8	9	8	9	5	6
Onda I	516 ± 81	600 ± 129	264 ± 48	196 ± 32	105 ± 8	116 ± 34
Onda II	1276 ± 175	1241 ± 151	832 ± 103	715 ± 110	207 ± 30	319 ± 61
Onda III	657 ± 141	669 ± 78	207 ± 67	186 ± 58	100 ± 33	127 ± 54
Onda IV	500 ± 77	537 ± 66	532 ± 87	498 ± 36	337 ± 44	315 ± 46

Tabla 16. Amplitudes de las ondas I a IV (nV) por grupo experimental y momento de estudio; estadísticos descriptivos. No se observaron diferencias entre ambos grupos. Se muestra la media ± ESM.

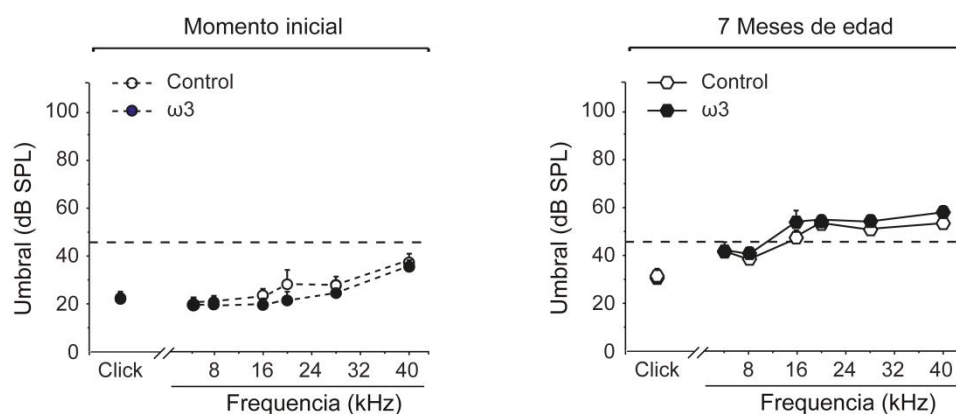
n	Umbral DP (dB SPL)			
	Edad (meses)			
	2 (Inicio)		7	
	Control	Omega-3	Control	Omega-3
	3	4	4	4
Test				
8 kHz	35 ± 5	35 ± 5	43 ± 9	35 ± 5
10 kHz	40 ± 0	45 ± 5	55 ± 5	50 ± 4
14 kHz	50 ± 10	50 ± 10	66 ± 2	53 ± 3
18 kHz	55 ± 5	58 ± 6		
22 kHz	68 ± 3	65 ± 0		

Tabla 17. Umbrales DP de la componente $2f1-f2$ tras estimulación con tonos puros correspondientes a las frecuencias centrales 8, 10, 14, 18 y 22 kHz.

n	Amplitud $2f1-f2$ (dB SPL)			
	Edad (meses)			
	2 (Inicio)		7	
	Control	Omega-3	Control	Omega-3
	3	4	4	4
Test				
8 kHz	101 ± 11	103 ± 8	65 ± 1	98 ± 2
10 kHz	94 ± 2	90 ± 9	75 ± 3	85 ± 4
14 kHz	84 ± 0	87 ± 2	75 ± 3	85 ± 5
18 kHz	90 ± 9	80 ± 16		
22 kHz	84 ± 1			

Tabla 18. Amplitud de la componente $2f1-f2$ de los DPOAE tras estimulación con tonos puros correspondientes a las frecuencias centrales 8, 10, 14, 18 y 22 kHz.

A



B

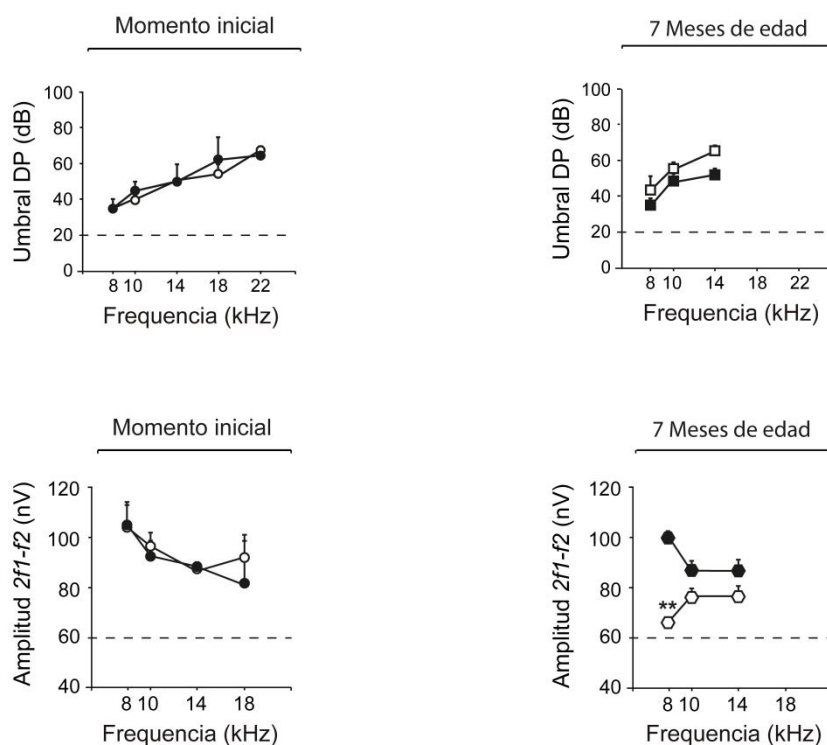
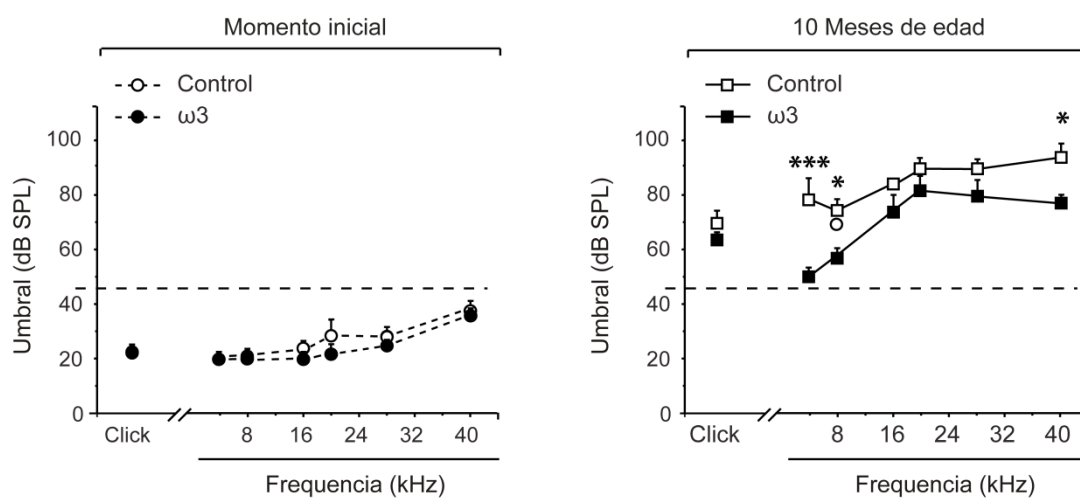


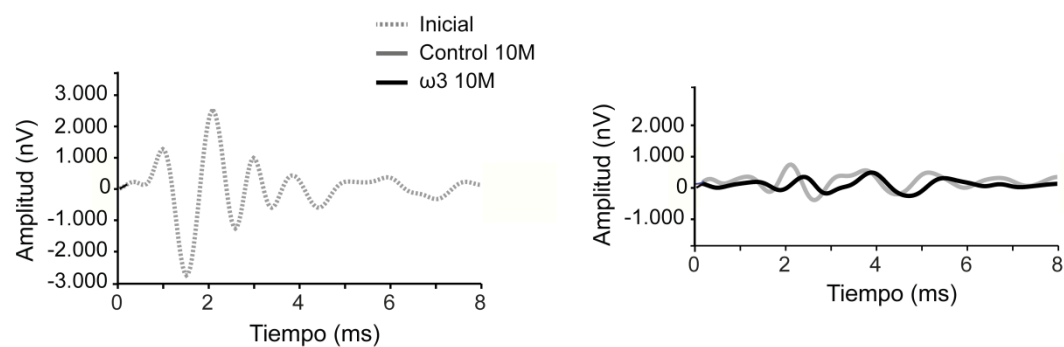
Figura 28. Resultados de ABR y DPOAE para los grupos control y omega-3 a los 7 meses de edad.

(B) Umbral ABR en respuesta a click y tonos puros en los grupos control (blanco) y omega-3 (negro) en los momentos inicial y 7 meses de edad. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. (C) Umbral DP (dB SPL) y amplitudes de la componente $2f1-f2$ (nV) en respuesta a los tonos primarios 8, 10, 14, 18 y 22 kHz para los ratones de los grupos control (blanco) y omega-3 (negro). A esta edad, los ratones del grupo omega-3 mostraron una amplitud significativamente mayor con respecto al grupo control, de la componente $2f1-f2$ para la frecuencia de 8 kHz. $\omega 3$: omega-3. Se muestran los valores de media \pm ESM. Significación estadística: $p < 0,01$ (**).

A



B



C

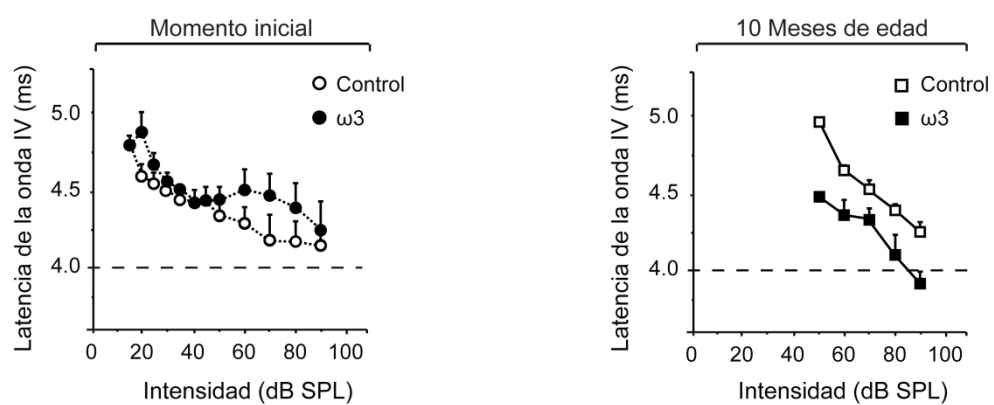


Figura 29. Los ratones suplementados con omega-3 muestran signos de un retardo en la pérdida auditiva asociada al envejecimiento. (A) Umbrales ABR en respuesta a click y tonos puros en los grupos control (blanco) y omega-3 (negro) en los momentos inicial y a los 10 meses de edad. Los animales del grupo omega-3 mostraron menores umbrales ABR para las frecuencias de 4 ($p < 0,001$), 8 y 40 kHz ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control. (B) Imagen de las ondas click representativas a 20 dB por encima del umbral, en los momentos inicial y 10 meses de edad en ambos grupos. (C) Gráficos de latencia-intensidad de la Onda IV en los momentos inicial y 10 meses de edad. Se observa un ligero retardo en la aparición de las ondas de ABR, especialmente de la onda I, en el grupo control con respecto al grupo omega-3. $\omega 3$: omega-3. Se muestran los valores como media \pm ESM. Significación estadística: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**).

4. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre la morfología coclear a los 7 meses de edad

El estudio morfológico a los 7 meses de edad, mostró la existencia de una pérdida elevada de células ciliadas en el órgano de Corti coincidente con el descenso en la amplitud de la componente *2f1-f2*. Esta pérdida fue similar en ambos grupos y especialmente marcada en el caso de las células ciliadas externas (OHC; pérdida de 39% de OHCs y del 10% de IHCs). También se observó una pérdida semejante de las neuronas del ganglio coclear, y dado que los ratones de ambos grupos mostraron una citoarquitectura muy similar, solamente se muestra una imagen representativa de cada área de la cóclea tanto para histología convencional como para inmunohistoquímica (*Figura 30*).

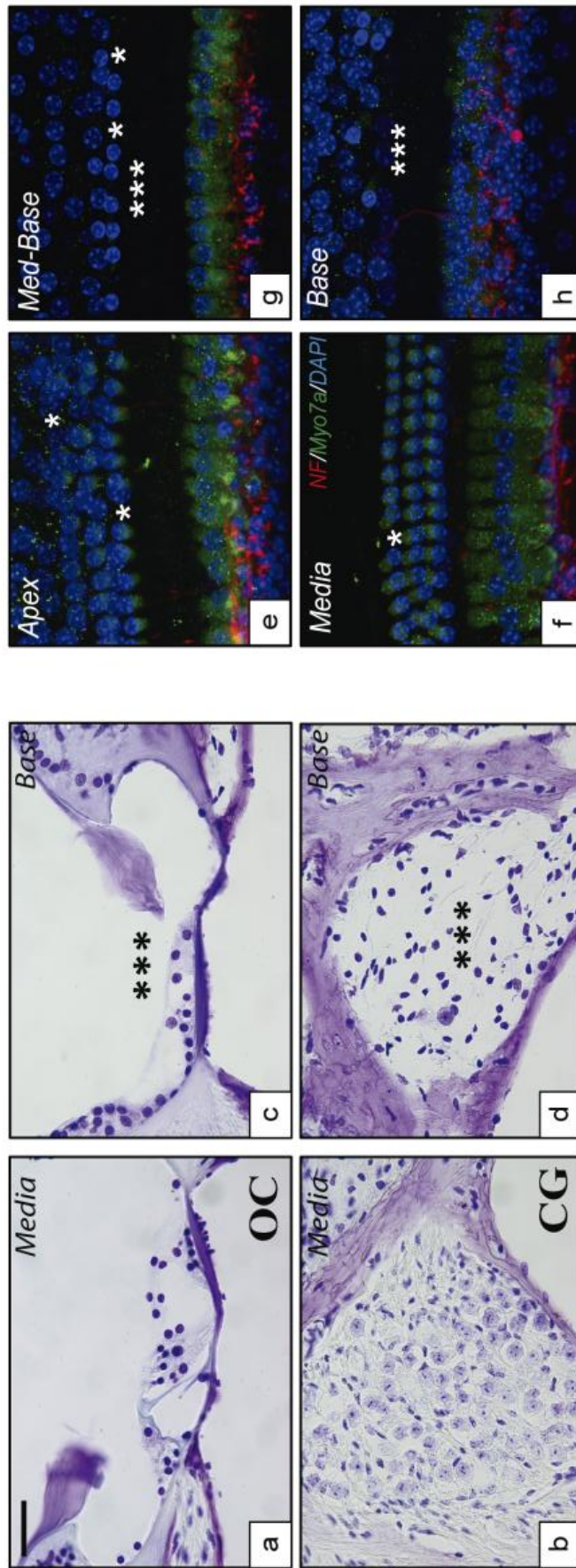


Figura 30. Morfología coclear de los grupos control y omega-3 a los 7 meses de edad. (a-d) Se muestran en detalle imágenes del órgano de Corti (OC) y el ganglio coclear (CG) en la base y media cocleares. Las estrellas muestran la alteración del órgano de Corti y la ausencia de neuronas en la base en c y d, respectivamente. (e-h) Inmunohistoquímica en el órgano de Corti en plano de Miosina VIIa (Myo7a) y neurofilamento (NF). Una única estrella muestra la ausencia de una célula ciliada externa (OHC), mientras que 3 estrellas muestran la pérdida completa de una o más filas de OHCs. Barras de escala: 25 μm (a-d); 10 μm (e-h).

5. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre el ciclo de la metionina en la cóclea a los 10 meses de edad

Se tomaron muestras a los 4 meses de animales del grupo control (4 meses de edad; Control 4 M) con fines comparativos. A los 10 meses de edad, los ratones del grupo omega-3 mostraron valores de expresión similares al grupo control de 4 meses. Sin embargo, el grupo control de 10 meses mostró una reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de expresión de ARNm de *Bhmt* y *Cbs* y un aumento en los de *Ada* (~50%) en comparación con el grupo omega-3 ($p < 0,05$). Además, este grupo presentó una reducción significativa en los niveles de expresión del resto de genes analizados, excepto de *Ada*, con respecto al grupo control de 4 M ($p < 0,05$; *Figura 31A*).

Los cambios observados en la expresión podrían dar lugar a alteraciones en los niveles de las proteínas correspondientes. Así, se observaron niveles significativamente más aumentados de la proteína BHMT (~45%) en el grupo omega-3 con respecto al control y de CBS (~60%) del grupo control con respecto al omega-3 ($p < 0,05$). No se observaron más cambios entre grupos a nivel de proteína (*Figura 31B*). De forma adicional, se comprobó el grado de homocisteinilación proteica mediante *Western blotting* empleando extractos de cóclea y el anticuerpo anti-Hcy (*Figura 31C*). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$).

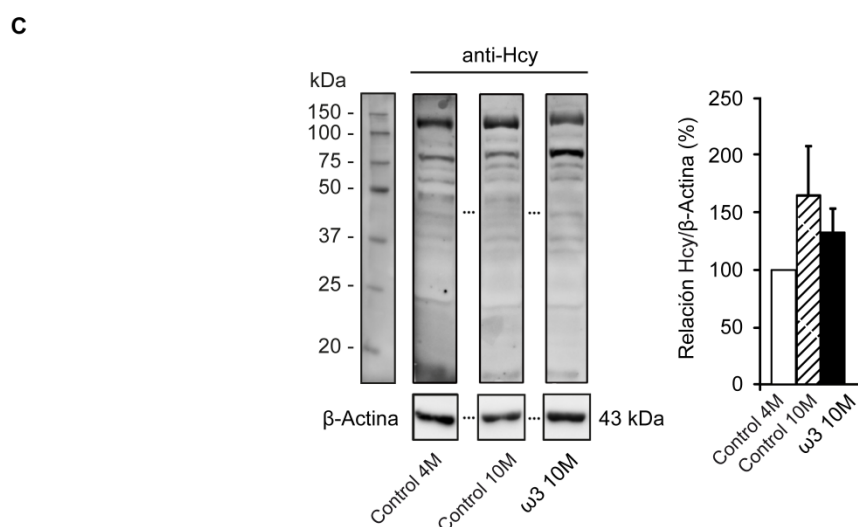
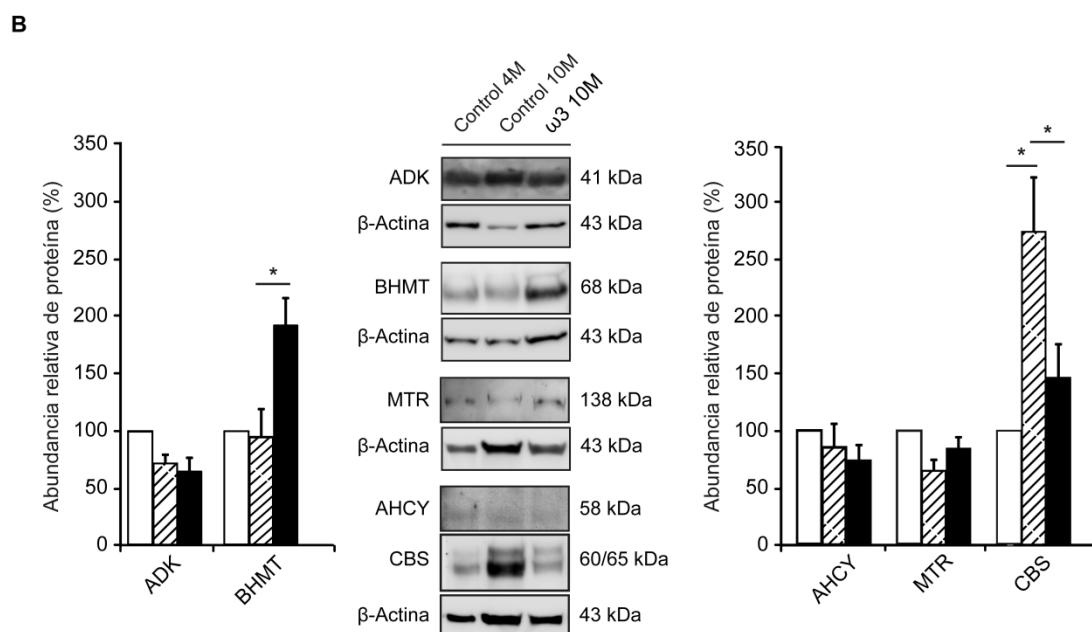
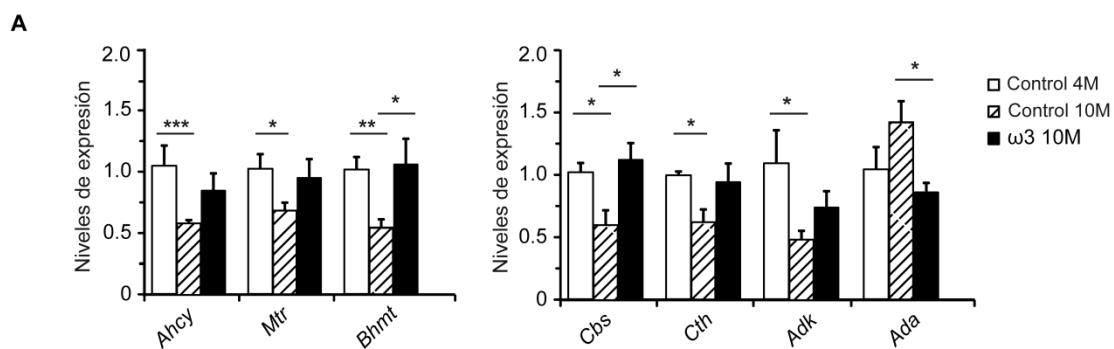


Figura 31. Cambios en el metabolismo de la metionina a los 10 meses de edad. (A) Niveles de expresión de ARNm medidos por RT-qPCR de *Ahcy*, *Mtr*, *Bhmt*, *Cbs*, *Cth*, *Adk* y *Ada*. A los 10 meses de edad, el grupo omega-3 mostró niveles de expresión similares para todos los genes en comparación con los animales jóvenes. En cambio, el grupo control mostró un descenso significativo de los niveles de *Bhmt* y *Cbs* con respecto al grupo omega-3 así como un incremento en los niveles de *Ada*. Además, el grupo control mostró un descenso en los niveles de expresión de todos los genes excepto de *Ada* con respecto al grupo joven ($p < 0,05$). Se empleó el gen *Rn18S* como endógeno. (B) Niveles de proteína medidos mediante *Western blotting* de ADK, BHMT, AHCY y CBS. Se utilizó la β -actina como control de carga. Los ratones del grupo omega-3 mostraron un incremento en los niveles de proteína de ADK y BHMT ($p < 0,05$). (C) Imagen representativa del *Western blotting* y el estudio densitométrico de anti-homocisteína. El promedio del grupo joven se consideró como el 100% con fines gráficos. $\omega 3$: *omega-3*. Se presentan los valores como la media \pm ESM de al menos 3 animales por cada condición. [#]Control 10M vs. $\omega 3$ 10M; *Control 4M vs. $\omega 3$ 10M. Significación estadística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. Efecto de la suplementación con omega-3 sobre el estado inflamatorio de la cóclea a los 10 meses de edad

Se ha descrito que los niveles de IGF-I disminuyen con el envejecimiento al mismo tiempo que los niveles de algunas citoquinas pro- y anti-inflamatorias varían significativamente (Corpas Cobisa, 1993; Ye & Johnson, 2001; Godbout & Johnson, 2004). Por este motivo, se decidió llevar a cabo el estudio de los niveles de expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en los grupos de estudio a los 10 meses de edad comparándolos con el grupo de 4 meses. El grupo omega-3 mostró niveles de expresión de todas las citoquinas y de los genes implicados en el estrés oxidativo similares al grupo joven (*Figura 32A*). Por el contrario, el grupo control a los 10 meses mostró una disminución en la expresión de *Igf1*, *Igf1r* y *Tgfb1r* ($p < 0,05$) con respecto al grupo omega-3; ahora bien, los ratones del grupo control de 10 meses mostraron un incremento en los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *Il1b* y *Il6* y un descenso de la anti-inflamatoria *Il10* con respecto a los otros dos grupos ($p < 0,05$). Los genes *Tgfb1* y *Tnfa* permanecieron sin alteraciones entre grupos (*Figura 32A*).

El estudio mediante *Western blotting* de las cascadas de señalización de la respuesta inflamatoria mostró un aumento en la fosforilación de JNK en el grupo control con respecto al grupo omega-3 a los 10 meses de edad ($p = 0,017$). Se observó un aumento en los niveles de fosforilación de p38 α para ambos grupos con respecto al grupo control de 4 meses ($p < 0,05$). No se vieron diferencias entre los grupos control y omega-3 para la fosforilación de ERK (*Figura 32B*).

Estos datos sugieren que progresión del envejecimiento auditivo se ralentiza en el grupo suplementado con omega-3.

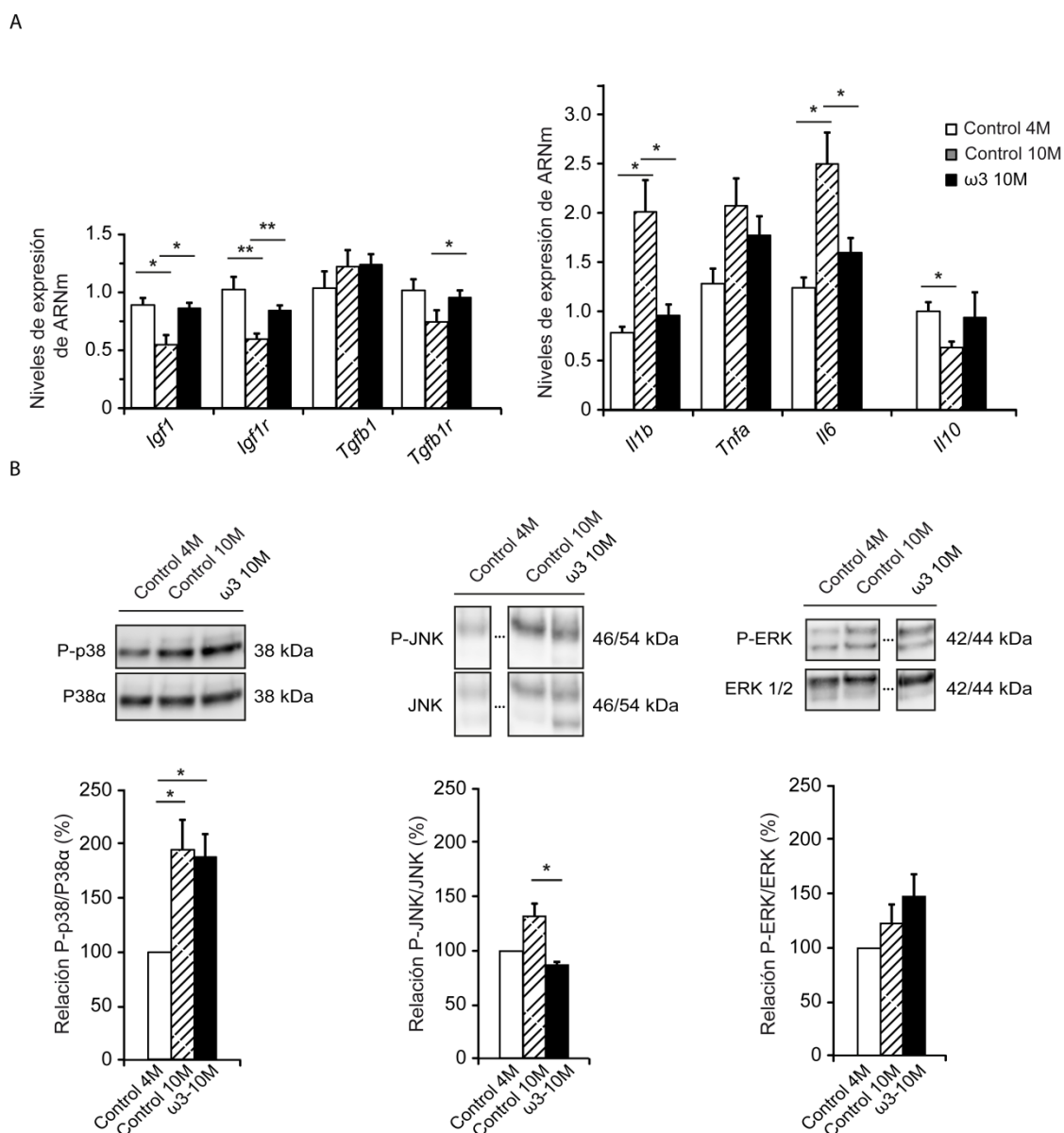


Figura 32. Inflamación a los 10 meses de edad. (A) Niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con la inflamación. El grupo omega-3 mostró niveles de expresión similares a los observados para el grupo joven en todos los genes analizados. Sin embargo, a los 10 meses de edad, el grupo control mostró un incremento significativo en los niveles de expresión de *Il1b* e *Il6* y un descenso en los niveles de *Il10*, *Igf1*, *Igf1r* y *Tgfb1r*. Se emplearon *Rn18S* y *Rplp0* como genes de referencia. (B) Niveles de proteína de fosfo-p38, fosfo- JNK y fosfo-ERK medidos por *Western blotting* utilizando p38α, ERK 1/2 y JNK como controles de proteína total. Se observó un incremento en la fosforilación proteica de p38 en ambos grupos de 10 meses con respecto al grupo control de 4 meses. Además, se vio un descenso en los niveles de proteína de la quinasa anti-inflamatoria fosfo-JNK en el grupo omega-3 con respecto al grupo control. ω3: omega-3. Se presentan los valores como la media ± ESM de al menos 3 animales por cada condición. # Control 10M vs. ω3 10M; * Control 4M vs. ω3 10M. Significación estadística: p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***)

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Algunas de las enfermedades asociadas con la inflamación crónica y con el envejecimiento son la diabetes, las patologías cardiovasculares o las enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Lopez-Otin *et al.*, 2013; DeCarlo *et al.*, 2014). La relación entre estas enfermedades y la sordera fue sugerida hace casi 50 años en algunos estudios epidemiológicos (Rosen & Olin, 1965; Rosen *et al.*, 1970). Sin embargo, este tema pasó desapercibido durante los años siguientes, no retomándose hasta hace poco más de una década.

La pérdida auditiva es uno de los campos en los que los ensayos de intervención nutricional pueden tener mayor potencial preventivo. Al respecto, estudios de intervención dietética han mostrado la existencia de prevención auditiva o atenuación de la sordera en pacientes suplementados, entre otros, con ácido fólico (Durga *et al.*, 2007), ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (Rosen *et al.*, 1970; Dullemeijer *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2010; Stefanutti *et al.*, 2013a) o D-metionina (Ge *et al.*, 2014). Asimismo, estudios epidemiológicos a nivel mundial han mostrado una asociación entre la deficiencia en varios nutrientes esenciales y la pérdida auditiva (Houston *et al.*, 1999; Cadoni *et al.*, 2004; Gok *et al.*, 2004; Lasisi *et al.*, 2010; Attias *et al.*, 2012; Karli *et al.*, 2013; Emmett & West, 2014). El origen de dicha deficiencia en los países desarrollados se debe no solamente a problemas de malnutrición sino también a lo que se conoce como una densidad de nutrientes inadecuada o insuficiente, esto es, a la alimentación inadecuada de la población.

Los dos primeros modelos animales analizados en este estudio se concentran en la relación entre el déficit de ácido fólico y la sordera, debido a la gran cantidad de estudios que los relacionan directamente. Dadas las propiedades vasodilatadoras (Morgan *et al.*, 2006) y antiinflamatorias (Calder, 2004; 2013) atribuidas a los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, la última parte de este trabajo se centró en el estudio del efecto de estos ácidos grasos sobre la pérdida auditiva asociada al envejecimiento. Además, cabe resaltar que también existen estudios interesantes realizados con otros ácidos grasos poliinsaturados (Seti *et al.*, 2009).

I. El metabolismo de la metionina tiene características especiales en la cóclea

El ácido fólico es necesario para las reacciones de remetilación de la Hcy catalizada por la MTR a la vez que la Hcy también resulta esencial para el reciclaje de los folatos. Curiosamente, el metabolismo de la metionina en la cóclea se desconocía prácticamente por completo, por lo que en este trabajo se llevó a cabo una caracterización del mismo. La mayoría de los genes involucrados en el metabolismo de la metionina mostraron el perfil de tejido extra-hepático (niveles de expresión elevados de *Mat2a*) y no-linfoide (expresión de *Adk* frente a la de *Ada*) (Vlajkovic *et al.*, 2010; Pajares & Markham, 2011). No obstante, los genes involucrados específicamente en los procesos de remetilación mostraron un patrón específico, donde los niveles de expresión de *Mtr* y *Bhmt* fueron similares y los de *Bhmt2* bajos, transformando la cóclea en un subtipo de tejido entre los extrahepáticos. Las proteínas correspondientes también se detectaron en *immunoblots*, a pesar de sus bajos niveles en este tejido. Se encontraron bandas con una migración anómala en el caso de las proteínas BHMT y AHCY. Estas migraciones podrían ser compatibles con modificaciones post-traduccionales y sugieren cambios en su comportamiento (*i.e.*, a nivel proteico). Se han realizado algunos estudios de espectrometría de masas a gran escala donde se han identificado diversas modificaciones en estas proteínas (Hornbeck *et al.*, 2012), aunque su impacto sobre la función de la BHMT y la AHCY apenas se ha explorado (Pajares & Perez-Sala, 2006).

II. El déficit en ácido fólico causa una aceleración de la pérdida auditiva asociada al envejecimiento

Varios tipos de sordera, incluyendo la sordera asociada al envejecimiento y la sordera por ruido, se han asociado con niveles bajos de folato en glóbulos rojos y suero en pacientes (Houston *et al.*, 1999; Gok *et al.*, 2004; Lasisi *et al.*, 2010). En algunos casos, además, estas alteraciones se han visto acompañadas de niveles elevados de tHcy en plasma (Cadoni *et al.*, 2004).

En este estudio se han empleado dos modelos animales con déficit nutricional en folato durante 2 u 8 meses que presentaron tanto niveles bajos de folato como hiperhomocisteinemia, convirtiéndolos, por tanto, en modelos adecuados para el estudio de la asociación de estas alteraciones con la sordera. De acuerdo con lo descrito previamente en la literatura (Achon *et al.*, 2002; Maestro-de-las-Casas *et al.*, 2013), los

niveles plasmáticos de vitamina B6 permanecieron sin cambios. Además, el modelo de déficit de ácido fólico a largo plazo, presentó una alteración tanto en el peso del animal como en los parámetros sanguíneos en la región periférica y de la médula ósea, resultados compatibles con una anemia por insuficiente hematopoyesis. Estos datos concuerdan con los resultados descritos en otros modelos de deficiencia en folatos tanto en pacientes (Herbert, 1968), como en modelos animales (Bills *et al.*, 1992; Salojin *et al.*, 2011).

La evaluación de la función auditiva en las ratonas C57 deficientes en folato mostró un aumento drástico de los umbrales auditivos con respecto al grupo control, especialmente acusado en las frecuencias altas. Estos resultados relacionan directamente la deficiencia en folato y la hiperhomocisteinemia con la sordera profunda. Al mismo tiempo, se observó un elevado nivel de homocisteinilación proteica coclear. Ambos hechos, unidos al descenso en la amplitud de las ondas I y IV confirmaron la existencia de un deterioro prematuro de las sinapsis de las células ciliadas, similar al descrito para modelos animales de sordera asociada con el estrés oxidativo tras una exposición a ruido (Kujawa & Liberman, 2009).

La función auditiva de las ratonas de la estirpe CBA/Ca ha sido estudiada por numerosos autores en profundidad (Li & Borg, 1991; Li *et al.*, 1993; Ohlemiller *et al.*, 2011). Se ha descrito que las ratonas de esta estirpe muestran una pérdida auditiva asociada al envejecimiento gradual y cuyo inicio se sitúa en torno a los 12-18 meses (Li & Borg, 1991). Por este motivo, a los 10 meses de edad, tanto el grupo control como el deficiente mostraron umbrales auditivos de ABR dentro de la normalidad para la estirpe. Sin embargo, aunque se obtengan umbrales de ABR normales, algunos estudios en modelos animales han mostrado que puede existir una degeneración subyacente de las células ciliadas externas (OHC) que solo puede detectarse mediante la técnica de los DPOAE (Kujawa & Liberman, 2009). Así, las ratonas CBA deficientes mostraron un empeoramiento de los umbrales DP y un descenso en la amplitud de los mismos con respecto al grupo control, confirmando que el déficit en folato afecta al sistema auditivo. Dado que nos encontramos frente a dos modelos de sordera muy diferentes, es lógico pensar que el grado de afectación del déficit en folato en el sistema auditivo podría diferir, en parte, debido al componente genético de las estirpes de ratón, al igual que se ha observado con algunos tipos de sordera genética en estudios epidemiológicos en pacientes, como la relación que parece existir entre la mutación *MTHFR* C677T y la

sordera, siendo su papel diferente en función de la población estudiada (Durga *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2011; Fusconi *et al.*, 2012).

Hoy en día se considera la presbiacusia como una sordera de tipo multifactorial en la mayoría de los casos, siendo la de tipo metabólico la más común en personas (Gates & Mills, 2005). Existen muchos modelos animales que representan un ejemplo de presbiacusia metabólica, incluyendo a los ratones de la estirpe C57, que muestran signos de patología metabólica en el ámbito de la estría vascular cuando se encuentran en un estado avanzado de envejecimiento (Hequembourg & Liberman, 2001; Ohlemiller & Gagnon, 2004).

El estudio histopatológico de los ratonas C57 deficientes en folato mostró una afectación en varias poblaciones celulares de la cóclea. Así, tanto el órgano de Corti, como el ganglio coclear y las estructuras de la pared lateral, incluyendo la estría vascular, se vieron seriamente dañados. Al mismo tiempo, se observó un gradiente en el deterioro coclear. Mientras que se detectó una pérdida celular severa en la base y signos de daño en la vuelta media (incluyendo la presencia de células apoptóticas), no se encontró ninguna o prácticamente ninguna señal de daño con respecto al ápex coclear. Estos resultados son comparables con los observados en pacientes, donde la pérdida de frecuencias auditivas suele producirse en una progresión de altas a bajas (Gates & Cooper, 1991).

En relación al estudio de la morfología coclear en las ratonas CBA deficientes en folato se observó una pérdida celular en el órgano de Corti que denotó el inicio de la pérdida auditiva. En cambio, el estudio de la patología auditiva mediante secciones no permitió observar cambios significativos con respecto al grupo control, no obstante, dados los resultados obtenidos con la técnica de DPOAE, la posibilidad de que el grupo deficiente pudiese mostrar una menor cantidad de células ciliadas externas no puede descartarse.

Por otro lado, y debido al efecto del déficit de ácido fólico sobre el resto del organismo de las ratonas estudiadas en el momento del análisis final, las diferencias detectadas en la función auditiva de las ratonas CBA fueron muy tenues. Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios en los que se comience la privación de ácido fólico a edades más avanzadas (10-12 meses) para poder alcanzar conclusiones.

Los resultados obtenidos en las ratonas C57, muestran un claro envejecimiento prematuro de la función auditiva como consecuencia de la deficiencia en ácido fólico, con afectación de todas las estructuras cocleares, pudiendo considerarse esta pérdida auditiva, por tanto, como una presbiacusia de tipo metabólico. Esta observación será discutida en los siguientes puntos.

a. El déficit en folato causa un desequilibrio en el metabolismo de la metionina en la cóclea

La deficiencia en ácido fólico en las ratonas C57 provocó una alteración en el patrón de expresión génica de la cóclea, viéndose disminuida la expresión de *Ahcy*, *Mtr* y *Bhmt*. De acuerdo con estos resultados, el ratón nulo para la Conexina 30 (*Cx30*^{-/-}) también mostró un descenso en los niveles de *Bhmt*, aunque a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, en dicho modelo los niveles de expresión de *Ahcy* se vieron ligeramente aumentados (Cohen-Salmon *et al.*, 2007). El estudio en este modelo animal no mostró ningún otro cambio en genes involucrados en estas rutas metabólicas. De igual modo, tampoco se observaron cambios en los niveles de expresión de ARNm de *Adk* o de su proteína en el estudio de un modelo de rata por exposición a ruido (Cohen-Salmon *et al.*, 2007; Vlajkovic *et al.*, 2010).

Los resultados de expresión obtenidos para el modelo de ratona C57 deficiente en folato reflejaron una correlación con los obtenidos en *Western blotting* en el caso de AHCY, BHMT y ADA, mientras que las señales de las formas de *splicing* alternativo de CBS y de MTR siguieron un patrón diferente. Se aprecia que el descenso en la expresión de ARNm no se refleja en los niveles de proteína observados. Esto puede ser debido a cambios en su vida media, y, por tanto, difícilmente valorables en estado estacionario (Vogel & Marcotte, 2012). En congruencia con esta línea de investigación/hipótesis, se ha descrito cómo la unión de la cobalamina o vitamina B12 con la proteína MTR parece estabilizar a esta enzima (Yamada *et al.*, 2000), efecto que podía esperarse en el modelo de deficiencia en folato como intento de reciclar el poco folato aún disponible. En conjunto, los cambios inducidos por la deficiencia en folato en el metabolismo de la metionina parecen dirigirse hacia el descenso en la síntesis de la Hcy y su reciclado, mediante el descenso de AHCY y BHMT. Al mismo tiempo el descenso de CBS y el aumento de ADA favorecen su acumulación siendo el efecto neto el incremento en el uso

de la adenosina. Así, se reduce la utilización de la Hcy en la remetilación y en la vía de la transulfuración. En este contexto, el aumento en la eliminación de adenosina podría limitar la protección de la cóclea frente al daño oxidativo llevado a cabo a través del aumento en la señalización de adenosina (Vlajkovic *et al.*, 2011). Un inconveniente a añadir que podría afectar a la función coclear proviene de la reducción del flujo de la Hcy a través de la vía de la transulfuración. La CBS y la cistationasa son capaces de sintetizar H₂S, cuyo papel protector como un dilatador vaso-coclear ha sido descrito en la sordera asociada al ruido (Li *et al.*, 2011). Un descenso en la producción de H₂S podría estar contribuyendo a los cambios detectados en los capilares de la estría vascular de las ratonas deficientes, en concordancia con el descenso de la densidad vascular que se ha descrito anteriormente en otros modelos de sordera como el del ratón mutante en *Cbs*^{+/-} (Kundu *et al.*, 2012).

En conjunto, las alteraciones en el metabolismo de la metionina detectadas sugieren la presencia de niveles altos de Hcy en la cóclea de las ratonas deficientes, y en efecto, las ratonas deficientes mostraron un incremento en la inmunotinción de Hcy unida a proteínas detectado mediante *Western blotting*. Estos datos son similares a los obtenidos en la estría vascular para el mutante de la *Cx30*^{-/-} (Cohen-Salmon *et al.*, 2007), asociado también con un descenso en la expresión de *Bhmt*. Ambos resultados aluden al papel fundamental de la BHMT como clave para la regulación de los niveles de Hcy en la cóclea. Además, la alteración de los niveles de Hcy en ambos modelos sugiere que dicha variación podría ser general para otras patologías auditivas metabólicas pudiendo así, considerar a la Hcy como un marcador temprano de daño auditivo.

El incremento en los niveles de Hcy podría causar la disfunción coclear mediante uno o varios de los mecanismos siguientes:

- i. Un incremento en los niveles de homocisteinilación proteica, una modificación post-traducciona que causa la inactivación y agregación de proteínas con el consecuente deterioro en su función (Jakubowski & Glowacki, 2011).
- ii. Un descenso en el flujo sanguíneo debido a la arterioesclerosis del oído interno, en la cual los niveles elevados de Hcy constituyen un determinante, como se ha sugerido en numerosos estudios

epidemiológicos con anterioridad (Rosen & Olin, 1965; Johnsson & Hawkins, 1972; Makishima, 1978).

- iii. Una sobreexcitación de los receptores de D-aspartato por el agonista de Hcy, un proceso que también se ha asociado con el daño auditivo (Puel *et al.*, 1991; Lipton *et al.*, 1997).

b. El déficit en folato causa un desequilibrio del estrés oxidativo en la cóclea

A lo largo de los últimos años, varios autores han enfocado su trabajo en el estudio de la asociación entre la pérdida auditiva y el estrés oxidativo (Lautermann *et al.*, 1997; Jacono *et al.*, 1998; Evans & Halliwell, 1999). En concreto, algunos han mostrado cómo una exposición excesiva a radicales libres de oxígeno (ROS) o un descenso en los niveles de antioxidantes disponibles, llevan a la aceleración del daño oxidativo asociado a la edad (Sohal & Weindruch, 1996; Buchowski *et al.*, 2012; Kujawa & Liberman, 2009). La sordera causada por la deficiencia en folato también lleva al desequilibrio oxidativo mediante la acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como muestran varios indicadores, entre los que se encuentran:

- i. Los niveles aumentados de las proteínas p22phox y MnSOD.
- ii. Un descenso en la expresión de *Cat*, *Gpx4* y *Gss*.
- iii. Un incremento en los niveles de 3-NT en la estra vascular y el ganglio coclear.
- iv. Variaciones en los niveles de GSH y GSSG.

La acumulación de especies reactivas y metabolitos procedentes de tampones redox celulares (*i.e.* NADP⁺, NADPH, GSH, GSSG) podría estar contribuyendo a la desregulación del metabolismo de la metionina. De hecho, se sabe que el estrés oxidativo altera la función de muchas enzimas de la ruta, como se ha demostrado principalmente en la patología hepática (Pajares & Perez-Sala, 2006; Delgado *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2012; Pajares *et al.*, 2013). El mantenimiento de la función de la célula requiere la eliminación de especies reactivas que puedan dañarla (Banerjee, 2012; Radi, 2013; Lambeth & Neish, 2014), proceso que requiere la intervención de rutas de señalización. Los resultados obtenidos en el grupo deficiente en folato sugieren la intervención del complejo NOX en el incremento en la producción de ROS, lo que podría ser responsable del grado de muerte celular encontrado en el órgano de Corti. NOX se expresa en la

cóclea de la rata y se regula, entre otros, por estímulos nocivos como el ruido (Vlajkovic *et al.*, 2013). Algunos estudios han mostrado cómo en presencia de estrés oxidativo, los niveles proteicos de NOX4 y NOX3 no se vieron alterados, mientras que las subunidades activadoras, como p22phox, resultaron ser las proteínas responsables de la respuesta frente al estrés (Banfi *et al.*, 2004; Kundu *et al.*, 2009). En paralelo a la activación de NOX, el incremento en MnSOD sugiere un esfuerzo para eliminar el ión superóxido, altamente reactivo, produciendo peróxido en su lugar, con baja reactividad. La enzima MnSOD es un marcador de neuroprotección que se ve activada como mecanismo compensatorio frente al estrés (Sanchez-Alcazar *et al.*, 2003). Curiosamente, el ratón nulo *Sod1^{-/-}* es sordo (Keithley *et al.*, 2005). A pesar de esto, el descenso en los niveles de expresión de catalasa (*Cat*) sugiere un presunto daño en la eliminación de peróxido a través de esta reacción, efecto que se vería agravado si tenemos en cuenta la inhibición que puede producir la Hcy sobre esta enzima (Milton, 2008). El catabolismo compensatorio de peróxido se puede obtener mediante GPX, principalmente GPX1, el cual lleva al aumento en la producción de GSSG (Quintana-Cabrera *et al.*, 2012). GPX1 es capaz de emplear tanto el glutatión (GSH) como la γ -glutamylcisteína producida en el primer paso de la síntesis de GSH (Quintana-Cabrera *et al.*, 2012), hecho que podría subsanar la ligera reducción observada en la expresión de ARNm de *Gss* en el grupo deficiente. Asimismo, la expresión y niveles de enzima no tienen por qué corresponderse entre sí, dada la compleja regulación de la síntesis del glutatión, que incluye elementos de respuesta a antioxidantes presentes en promotores de genes, modificaciones post-transcripcionales y retroalimentación negativa de la GSH, entre otras (Lu, 2013). Por tanto, la combinación del acumulo de γ -glutamylcisteína, los niveles aumentados en la síntesis de GSH por la estabilización de la proteína GCLC y/o el incremento en la asociación al GCLM (disminuyendo su K_m a favor del glutamato y aumentando la K_i para el GSH), junto con el aumento en los niveles de síntesis de GSSG a través de las GPX y el reciclaje desequilibrado a través de GSR, podrían explicar por qué la relación GSH/GSSG se conserva normal en la cóclea tras una deficiencia en folato. La existencia de un grave desequilibrio redox en la cóclea de estos animales se confirmó además mediante la detección de niveles elevados de inmunomarcaje de 3-NT. Este metabolito es un producto de la acción del peroxinitrito, cuyos niveles se han visto elevados en el proceso de estrés oxidativo que sucede durante el envejecimiento auditivo (Jiang *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo también se conoce por ser el responsable de la alteración de los ciclos de la metionina y los folatos a diferentes niveles. Varias enzimas de estas rutas son susceptibles de verse afectadas dada su necesidad por co-factores y metales (Pajares & Perez-Sala, 2006; Delgado *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2012).

De este modo, el descenso en los niveles de folato, junto con el estrés oxidativo observado, modificaría no solamente los niveles de expresión de ARNm y proteínas, sino también la actividad enzimática, la distribución subcelular y la oligomerización como se ha descrito en varios estudios (Mosharov *et al.*, 2000; Lu & Mato, 2012; Pajares *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2014a). Siguiendo esta línea, se espera que el aumento de los niveles de p22phox active NOX y, por tanto, lleve a incrementar la concentración de NADP⁺. Este metabolito es conocido por favorecer la trimerización de la metionina adenosiltransferasa II, reduciendo su afinidad por la metionina (Gonzalez *et al.*, 2012), efecto que en última instancia garantizaría la síntesis de S-adenosilmetionina necesitada para la remodelación epigenética durante el estrés nutricional. Es posible que el efecto no sea esencial para las ratonas deficientes en folato cuyas dietas reciben suficiente aporte de cisteína y metionina para la síntesis del donante de grupos metilo y glutatión, pero el efecto parece derivar de un esfuerzo por corregir el índice de metilación incorrecto (relación SAM/SAH), que resulta de un descenso en la cóclea de los niveles de AHCY, que llevará al aumento de las concentraciones de SAH y a la inhibición de las transmetilaciones. Un efecto añadido a la alteración del metabolismo de la metionina en la cóclea, concretamente debido a los bajos niveles de BHMT, es la acumulación de betaína. El incremento en la concentración de este osmolito podría ser beneficioso para el mantenimiento del epitelio basal de la cóclea de las ratonas deficientes en ácido fólico.

En conjunto, nuestros resultados confirman que la ingesta insuficiente de ácido fólico en la dieta provoca una alteración en el metabolismo coclear, junto con un profundo desequilibrio oxidativo, que finalmente conducen a la sordera. La correlación positiva entre la hiperhomocisteinemia y la sordera en este modelo de deficiencia en folato también sugiere que la intervención nutricional podría ser una nueva ruta para conseguir terapias preventivas frente a la pérdida auditiva.

III. La suplementación con ácidos grasos omega-3 ralentiza la aparición de la sordera neurosensorial asociada al envejecimiento

Varios estudios epidemiológicos han mostrado cómo la suplementación a largo plazo con ácidos grasos omega-3 conduce al retardo en el envejecimiento auditivo (Dullemeijer *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2010). De modo similar, las ratonas suplementadas con omega-3 a lo largo de 8 meses mostraron mejores umbrales auditivos, especialmente a frecuencias bajas, con respecto al grupo control a los 10 meses.

Se han realizado varios estudios que muestran cómo la suplementación con ácidos grasos omega-3 conduce a una mayor dilatación vascular en los tejidos mediada por el citocromo P450, en modelos animales de ratón (Agbor *et al.*, 2012), conejo (Ellis *et al.*, 1990), cerdo y rata (Ye *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en estos estudios podrían estar contribuyendo a explicar por qué las ratonas suplementadas con omega-3 tienen mejor preservada su audición.

Los ácidos grasos omega-3 parecen ejercer una función distinta según la patología existente. Así, la suplementación con ácidos grasos omega-3 condujo a un descenso en la inflamación y en los niveles de apoptosis en modelos de roedores de muerte neuronal inducida por hipotiroidismo (Sinha *et al.*, 2009) y de lesión medular (Paterniti *et al.*, 2014). Por el contrario, cuando el estudio de suplementación se realizó en un modelo de células de carcinoma escamoso humano (TE-1), dicha muerte celular se vio aumentada (Kubota *et al.*, 2013). Se ha descrito en estudios con modelos de rata (German *et al.*, 2013) y modelos de ratón y células neurales humanas (Zhao *et al.*, 2011), que los omega-3 activan los receptores proliferadores de peroxisomas (PPAR) y de retinoides (RXR) lo cual les confiere un papel neuroprotector. Curiosamente, se ha visto que tanto los RXR (Raz & Kelley, 1999), como el PPAR, cuyo ratón mutante nulo es letal embrionario (Asami-Miyagishi *et al.*, 2004), tienen un papel fundamental en el desarrollo correcto del órgano de Corti de los roedores. No obstante, el papel de ambos en el oído adulto está aún por determinar. Estos hallazgos podrían por tanto conducir a pensar que las ratonas suplementadas con omega-3 presentan una mayor supervivencia celular, especialmente de las células ciliadas externas, lo cual reforzaría la explicación de por qué estas ratonas poseen mejores umbrales auditivos y mejores amplitudes de los DPOAE.

A los siete meses de edad, las ratonas C57 mostraron una pérdida de las células ciliadas del órgano de Corti, especialmente marcada en el caso de las células ciliadas externas. No se observaron diferencias morfológicas aparentes entre los grupos estudiados a esta edad. No se dispone de datos a edades más avanzadas por lo que no ha sido posible confirmar la hipótesis de una mejor supervivencia de las células ciliadas externas.

a. La suplementación con ácidos grasos omega-3 reduce los niveles de inflamación

El hecho de que los ácidos grasos omega-3 hayan mostrado efecto anti-inflamatorio en muchos estudios en relación con patologías como las enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas ha conducido a otros estudios en los que se ha buscado el posible efecto de estas moléculas sobre la sordera (Rosen *et al.*, 1970; Gates *et al.*, 1993; Dullemeijer *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2010; Stefanutti *et al.*, 2013b).

Los eicosanoides son las moléculas encargadas de modular la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria (revisado en Lewis *et al.*, 1990; Tilley *et al.*, 2001; Calder, 2010; 2014). La dieta predominante en el mundo occidental hace que las membranas celulares contengan gran cantidad de ácido araquidónico. Este ácido graso es precursor de eicosanoides pro-inflamatorios que provocan el aumento del estrés oxidativo y el incremento en la producción de TNF α , IL-1 β e IL-6 (revisado en Lewis *et al.*, 1990). Los ácidos grasos omega-3 compiten con el ácido araquidónico en las rutas de producción de eicosanoides, los cuales tienen menor reactividad en el caso de provenir de los omega-3 con respecto a los procedentes del ácido araquidónico (Grimminger *et al.*, 1995). Esto, unido a la producción de las E-y D-resolvinas (Calder, 2014), les confiere un papel central en la respuesta inflamatoria.

Se han llevado a cabo numerosos estudios que han mostrado cómo el tratamiento con EPA, con DHA o con ambos, provoca un descenso en la producción de TNF α , IL-1 e IL-6 (revisado en Endres *et al.*, 1995). Este descenso se observó tanto en sangre de pacientes (Endres *et al.*, 1989) como a nivel de ARNm (Bouwens *et al.*, 2009). De modo similar, existen estudios paralelos en modelos animales que también corroboran dicho descenso tanto a nivel sanguíneo (Grimm *et al.*, 1994) como de mensajero (Robinson *et*

al., 1996; Lin *et al.*, 2013). A su vez, estudios en cultivos celulares y células *ex vivo* de modelos animales y pacientes, han mostrado también una bajada en su liberación (Baldie *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1999) y en su expresión génica (Zainal *et al.*, 2009). En algunos modelos murinos esto se vio acompañado también de un aumento en los niveles de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10 (Draper *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013). Asimismo, estudios en ratones han mostrado que el efecto del EPA en la reducción de los pro-inflamatorios resulta más efectivo que el producido por el DHA (Bhattacharya *et al.*, 2007). En congruencia con estos estudios, se observó que mientras que las ratonas suplementadas con la dieta rica en omega-3, especialmente en EPA, mantuvieron sus niveles de ARNm similares a los del grupo control de 4 meses, las ratonas control de 10 meses mostraron un incremento en la cóclea de los niveles de expresión de ARNm de *Tnfa*, *Il1* e *Il6* y un descenso en los niveles de *Il10*. No debemos obviar que los cambios en los niveles de *Il10* y *Tnfa* no fueron significativos en el grupo control 10 meses con respecto al grupo omega-3 a pesar de la tendencia observada, debido a la variabilidad existente en este último grupo. Dado el pequeño tamaño muestral, no debemos descartar la posibilidad de que aumentando el tamaño muestral pudiera alcanzarse la significación. Estos resultados muestran, en su conjunto, una menor inflamación asociada al envejecimiento auditivo en las ratonas suplementadas con ácidos grasos omega-3.

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) se une al receptor IGF1R, activándolo y desencadenando la activación de cascadas descendentes que incluyen dos rutas principales: la PI3K-Akt y la cascada RAF/ERK. Ambas vías tienen un papel clave en la transmisión de señales desde los receptores de la membrana celular al núcleo mediante la interacción con otras proteínas (McCubrey *et al.*, 2011). Otras quinasas que se modulan en respuesta a este factor son la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 α y las SAPK (Vardatsikos *et al.*, 2009). El ratón deficiente para *Igf-1* mostró una reducción del 25% en las formas activadas de las proteínas ERK1/2 y de AKT y un gran aumento en la MAP quinasa p38 α activada en la cóclea. Los resultados obtenidos en este modelo animal indican que la deficiencia en IGF-I en la cóclea conduce a un descenso en la actividad de las vías de señalización encargadas de regular la proliferación y la supervivencia, y aumenta aquellas implicadas en la respuesta celular al estrés (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010; Murillo-Cuesta *et al.*, 2011). Por tanto, el descenso en la expresión de IGF-I podría estar indicando el aumento en la muerte celular y el estrés.

En mamíferos, los niveles de IGF-I en suero o plasma disminuyen con la edad (Riquelme *et al.*, 2010), habiéndose descrito un descenso de hasta el 50% en torno a los 70 años en el caso del hombre (revisado en Corpas *et al.*, 1993). No se conocen las causas exactas de esta disminución, aunque dada la relación existente entre la hormona del crecimiento, la obesidad y el envejecimiento, se cree que al aumentar los niveles de insulina en plasma asociados a estos procesos, esta hormona actúa sobre los receptores de IGF-I de la pituitaria y/o hipotalámicos, dando como resultado una inhibición negativa de la secreción de la hormona de crecimiento, y por tanto, de IGF-I (Reaven & Reaven, 1985). Estudios epidemiológicos y en modelos animales han mostrado cómo la suplementación con ácidos grasos omega-3, y especialmente con EPA, se ha correlacionado positivamente con la recuperación o mantenimiento de los niveles adecuados de IGF-I tanto en patologías de tipo agudo, entre las que se incluyen las quemaduras de alto grado en pacientes (Abribat *et al.*, 2000), como en enfermedades de tipo crónico asociadas al envejecimiento, como la artritis (Hurst *et al.*, 2010; Castellero *et al.*, 2011) o la osteoporosis humana (Moon *et al.*, 2012) o inducida en modelos animales (Fernandes *et al.*, 2008; Bonnet & Ferrari, 2011). Esta correlación también se ha observado para los niveles de expresión (Castillero *et al.*, 2011). Además, estudios en un modelo de células HCT116, han sugerido que los ácidos grasos omega-3 y omega-6 modulan la acción del IGF-I (Seti *et al.*, 2009). De modo semejante, las ratonas suplementadas con omega-3 mostraron unos niveles de expresión de *Igfl* e *Igflr* similares a los del grupo control de 4 meses mientras que las ratonas del grupo control mostraron un descenso significativo en la expresión de ambos genes.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento que incluye: TGF- β s, activinas, inhibinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). El TGF- β es crucial en la homeostasis de los procesos de crecimiento, diferenciación, apoptosis o adhesión celular, en diversos órganos (Danielpour & Song, 2006). Se ha descrito un papel central del TGF- β 1 en células del epitelio pigmentario de la retina y macrófagos como regulador negativo central de la expresión de la óxido nítrico inducible (iNOS). Este proceso ayuda al mantenimiento de la homeostasis (Vodovotz *et al.*, 1996). Además, también se ha observado un efecto inhibitor del TGF- β 1 sobre citoquinas pro-inflamatorias (TNF α y IL-1 β) en el ámbito de las células endoteliales de los capilares y vénulas, reduciendo así el reclutamiento de leucocitos en el lugar de la inflamación (Park *et al.*, 2000). Las

ratonas suplementadas con omega-3 mostraron un incremento en los niveles de expresión del receptor de *Tgfb1* (*Tgfb1r*) a los 10 meses de edad. Si bien los niveles de expresión del factor no aumentaron con respecto al grupo control de la misma edad, el aumento en la sensibilidad del receptor en las células de la cóclea hacia la molécula podría estar apuntando hacia un papel protector del TGF- β 1 en la cóclea, papel que en parte ayudaría a explicar el descenso en la expresión de ARNm de *Il1b*. Sería necesario realizar estudios complementarios para dilucidar el papel de TGF- β 1 en el envejecimiento coclear.

Las vías de las MAPK de p38, ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) y SAPK/JNK (proteínas quinasas activadas por estrés o quinasas nucleares Jun), se activan en respuesta, entre otros, al incremento del estrés oxidativo y de las citoquinas inflamatorias, como se ha mencionado anteriormente (Geng *et al.*, 1996; Wicovsky *et al.*, 2007; Poirrier *et al.*, 2010). Así, estudios en modelos animales han mostrado la activación en el oído de estas vías tras un daño por exposición a ruido (Maeda *et al.*, 2013), tras la administración de ototóxicos (Davis, 2000) o como consecuencia del envejecimiento (Sha *et al.*, 2009; Murillo-Cuesta *et al.* 2011). Las ratonas del grupo control de 10 meses mostraron un comportamiento parcialmente similar con un incremento en la activación de p38 α , JNK y citoquinas inflamatorias, pero con una falta de activación de la vía de ERK. Las ratonas del grupo omega-3 tampoco mostraron una prevención en la activación de p38 α , pero sí mostraron un descenso en la fosforilación de JNK. Aunque se ha observado que la suplementación con ácidos grasos omega-3 conduce a un descenso en los niveles de IL-6 e IL-1 β y en la fosforilación de las vías de estrés oxidativo en varios modelos experimentales (Babcock, Kurland *et al.* 2003, Kim, Cho *et al.* 2014), no parece tratarse de nuestro caso. Esto probablemente sea debido al origen del desencadenante de la pérdida auditiva en dichos estudios, el cisplatino (Kim, Cho *et al.* 2014), frente al desencadenante en nuestro estudio, la edad. La activación de la cascada de señalización de p38 también ha sido descrita en neuronas corticales en crecimiento en presencia de Hcy, cuyo metabolismo, como hemos visto en las ratonas deficientes en ácido fólico, se encuentra alterado en la sordera. Esta activación de p38 α dependiente de Hcy involucra la estimulación de los receptores de N-metil-D-aspartato y la activación de ERK. Sin embargo, puesto que la contribución a la activación de estas vías por parte de la población neuronal en la cóclea está limitada por la presencia de otros tipos celulares, no se observaron cambios en la ruta de ERK en las cócleas de las ratonas de los grupos control y omega-3 a los 10 meses de edad. No obstante, los motivos por los

cuales se observa una fosforilación aumentada de p38 α en los grupos control y omega-3 a los 10 meses con respecto al control de 4 meses podrían tener un origen diferente y no ha de descartarse que se trate del propio efecto del envejecimiento en la cóclea (Sha *et al.*, 2009). TNF α activa SAPK/JNK (Sluss *et al.*, 1994), lo cual desencadena una serie de reacciones que finalmente inducen la traslocación de NF- κ B al núcleo, estimulando la transcripción de los genes dependientes del mismo que, finalmente, conducen a la activación de cascadas inflamatorias (Cheshire & Baldwin, 1997; Hayden & Ghosh, 2004). Por otro lado, la inhibición de la activación de JNK protege frente al daño auditivo causado por ototóxicos o implantes cocleares inhibiendo la apoptosis (Pirvola *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Matsui *et al.*, 2004). Estos datos concuerdan con los resultados observados para las ratonas control de 10 meses, donde se observó un aumento de citoquinas pro-inflamatorias seguido del incremento en la activación de SAPK/JNK. Los niveles disminuidos de ARNm de estas citoquinas junto con la menor activación de la vía de JNK, apuntan a la existencia de un menor grado de inflamación en la cóclea de las ratonas suplementadas con omega-3.

La muerte de las células ciliadas incluye las rutas de la activación de las caspasas y de MAPK/JNK, que se activan como consecuencia de las citoquinas inflamatorias y el estrés oxidativo en respuesta a un daño (Abi-Hachem *et al.*, 2010). Se ha observado un descenso en la producción de ROS tras la suplementación con ácidos grasos omega-3 (Fisher *et al.*, 1990; Varming *et al.*, 1995; Luostarinen & Saldeen, 1996). Además, el estudio en modelos animales ha mostrado un descenso en la expresión de protectores del estrés oxidativo, como la catalasa o las Gpx y Gss con la edad en otros tejidos como el pulmón, el riñón, el corazón o el músculo (Liu & Dickinson, 2003; Cutler, 2005; Sullivan-Gunn & Lewandowski, 2013). Los resultados obtenidos en estos estudios explicarían por qué los niveles de *Cat* y de *Gss* fueron mayores en el grupo omega-3 con respecto al control, apoyando la idea de que en las ratonas suplementadas con omega-3 se observa un retardo en el envejecimiento auditivo.

En conjunto, estos resultados podrían estar indicando que el retardo en el envejecimiento se debe a la presencia de una menor activación en la vía de JNK. Sin embargo, no se debe descartar que la vía de JNK se active con posterioridad conduciendo a un incremento en la inflamación que lleve a un mayor envejecimiento auditivo en el

grupo suplementado con omega-3 dados los resultados obtenidos en la fosforilación de ERK.

b. El metabolismo de la metionina en la cóclea está mejor preservado tras la suplementación con ácidos grasos omega-3

En primer lugar, la suplementación con ácidos grasos omega-3 no indujo cambios en los niveles de tHcy o folato, como se ha observado en otros modelos nutricionales de suplementación a corto plazo en rata (Kulkarni *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). En segundo lugar, aunque se detectó una disminución en los niveles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo coclear de la metionina a los 10 meses de edad, estos cambios tuvieron un efecto limitado sobre los niveles de proteínas. De hecho, solamente se observó un incremento en los niveles proteicos de CBS en las ratonas de 10 meses del grupo control, sugiriendo un aumento del flujo a través de la vía de la transulfuración. Las diferencias entre los niveles en estado estacionario de varias de estas proteínas y los niveles de expresión de ARNm podrían sugerir cambios en su vida media, como los que por ejemplo tienen lugar durante el estrés oxidativo, como se ha demostrado previamente en líneas celulares de hepatoma (Delgado *et al.*, 2014). El aumento en los niveles de CBS puede deberse más a un requerimiento para la síntesis de niveles más elevados de H₂S, que a una necesidad de producir cisteína, dada la habilidad del H₂S para regular diferencialmente la síntesis de enzimas anti- y pro-oxidantes y mediadores anti- y pro-inflamatorios (Ingenbleek & Kimura, 2013; Kabil *et al.*, 2014a; Kabil *et al.*, 2014b). De hecho, varios fármacos sintéticos con capacidad de actuar como proveedores de H₂S, se han empleado para el tratamiento de la pérdida auditiva con resultados diversos (Lamm & Arnold, 1998; Mahmood *et al.*, 2014).

La suplementación con omega-3 provocó una reducción en los niveles de expresión de *Ada* a los 10 meses de edad, una proteína cuyos niveles son demasiado bajos como para ser detectados en ratonas C57 de 4 meses de edad, y por tanto, favoreció la eliminación de adenosina a través de ADK, la enzima principalmente responsable de esta tarea en la cóclea (Vlajkovic *et al.*, 2010). A su vez, la suplementación con omega-3 mostró un descenso en los niveles de *Bhmt* y *Cbs* en las ratonas control de 10 meses, llevando este cambio, sin embargo, a efectos opuestos a nivel proteico. Así, en el grupo suplementado, mientras que la BHMT aumentó notablemente sus niveles con respecto al resto de grupos, se observó un descenso en los niveles de CBS con respecto al control de

10 meses, siendo de este modo sus niveles similares a los observados en el grupo control de 4 meses. Resulta imposible realizar comparaciones con otros estudios de suplementación dado que los pocos estudios publicados que analizan los efectos de los omega-3 sobre la sordera no evalúan el metabolismo de la metionina (Church *et al.*, 2009; Church *et al.*, 2010). Por tanto, los resultados que sí están disponibles se refieren a hígado de rata o células de hepatoma HepG2. En estos estudios no se observaron cambios ni en la expresión de *Cbs*, *Ahcy* o *Mtr*, ni en la actividad de CBS o AHCY tras la suplementación con aceite de pescado (Huang *et al.*, 2010), o tras el cultivo en presencia de DHA, EPA o ácido α -linolenico (Huang *et al.*, 2012). Otros estudios a corto plazo mostraron un aumento en niveles de ARNm de *Bhmt* y *Cbs* en el hígado, pero no de *Ahcy*, tras la suplementación con varios tipos de ácidos grasos omega-3 de cadena larga, incluyendo EPA (Huang *et al.*, 2013). Algunos de estos estudios también mostraron la capacidad de los omega-3 de regular la expresión e identificaron elementos responsables en los promotores de *Mtr* y *Cbs*, entre otros genes del ciclo de la metionina (Huang *et al.*, 2012). Es posible que esto último pueda contribuir a explicar por qué se observan efectos opuestos en la expresión y niveles de proteína de la *Cbs* en las ratonas control a los 10 meses de edad.

Los cambios inducidos por la suplementación a largo plazo se dirigen hacia un aumento en la remetilación de Hcy a través de la síntesis de metionina empleando betaína, un producto que procede de la oxidación de colina (Pajares & Perez-Sala, 2006; Ueland, 2011). El aumento de la necesidad de metionina se puede explicar por el incremento en el requerimiento de SAM para las reacciones de metilación, incluyendo varias modificaciones epigenéticas. Tal efecto se ha visto en el hígado de modelos animales de suplementación con omega-3, donde se encontraron niveles aumentados de MAT (Ahmed *et al.*, 2014). Este incremento en la remetilación puede derivarse también de la incorporación de los omega-3 procedentes de la dieta en los fosfolípidos, dado que su hidrólisis produce eicosanoides anti-inflamatorios y otras moléculas relacionadas, con la resultante estimulación en la renovación de la fosfatidilcolina en las células. Este proceso podría derivar en un exceso de colina, que seguidamente se oxidaría a betaína, el donante de grupos metilo de la reacción catalizada por la BHMT (Pajares & Perez-Sala, 2006). El aumento en rata de la expresión de *Gnmt* y *Pemt* en el hígado tras la suplementación durante pocas semanas con varios tipos de omega-3, señala en esta dirección (Huang *et al.*, 2013). Sin embargo, la expresión y niveles proteicos de estas dos

metiltransferasas en la cóclea, las cuales están entre las mayores consumidoras de S-adenosilmetionina en el hígado (Mudd et al., 2007), se desconocen. La fosfatidilcolina sintetizada mediante PEMT suele ser preferentemente rica en ácido araquidónico y/o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (DeLong et al., 1999). Así, la suplementación con EPA podría derivar en la producción de fosfatidilcolina incluyendo EPA en su composición y reduciendo la inclusión de ácido araquidónico, como se ha detectado en medidas de algunos estudios llevadas a cabo en fosfatidilcolina plasmática (Bjorndal *et al.*, 2014).

Las diferencias observadas entre los niveles de expresión de ARNm y proteína se pueden explicar por cambios en su vida media, sin embargo, también se podrían interpretar como que en la última edad estudiada están empezando a suceder cambios asociados al envejecimiento auditivo en los animales control que todavía no se han plasmado en los ámbitos funcional ni metabólico.

El incremento en los niveles de proteína de BHMT en el grupo omega-3 a los 10 meses de edad sugiere por un lado el reciclaje de la Hcy, y por otro lado, la necesidad de metionina para la generación de SAM con la consecuente mejora en las metilaciones necesarias para el mantenimiento de la función coclear por más tiempo. Conjuntamente, la elevación de los niveles proteicos de CBS en el grupo control de la misma edad apunta a un posible envejecimiento coclear con una mayor progresión más rápida debido a la necesidad de eliminar la Hcy y de producir cisteína o H₂S.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La deficiencia en folato causa hiperhomocisteinemia y pérdida auditiva. Estos datos sugieren que la intervención nutricional para controlar los niveles de homocisteína podría ser una nueva vía de prevención de la pérdida auditiva, y apunta a la homocisteína como posible marcador temprano del daño auditivo.
2. La cóclea del ratón presenta un perfil de expresión de genes y enzimas del ciclo de la metionina propio de los tejidos extra-hepáticos con algunas características propias. Concretamente: i) los niveles de expresión de *Mtr* y *Bhmt* fueron similares, mientras que los de *Bhmt2* fueron bajos; ii) las proteínas BHMT y AHCY mostraron una movilidad distinta a la descrita en otros tejidos.
3. La deficiencia en ácido fólico provoca una alteración del patrón normal de expresión del ciclo de la metionina en la cóclea mostrando un descenso en la expresión de *Ahcy*, *Mtr* y *Bhmt* y en los niveles de proteína de AHCY, BHMT y CBS, y un incremento en los niveles de proteína de ADA, y de la Hcy local incorporada en proteínas. Estos cambios apuntan a la disminución de la síntesis de Hcy, de la remetilación y de la eliminación por la vía de transulfuración, lo cual conduce a un descenso en la producción de H₂S, y por tanto, a una menor protección de la estría vascular.
4. La ingesta insuficiente de ácido fólico en la dieta provoca un desequilibrio del estrés oxidativo en la cóclea. Este desequilibrio se pone de manifiesto por i) un incremento en las proteínas p22phox y MnSOD, en los metabolitos GSH y GSSG, y en el marcador de oxidación nitrosativa 3-NT y, ii) por un descenso en la expresión de ARNm de *Cat*, *Gpx4* y *Gss*.
5. La suplementación con ácidos grasos omega-3 provoca un retardo en la aparición de la sordera neurosensorial asociada al envejecimiento.
6. Los ácidos grasos omega-3 tienen un papel anti-inflamatorio y neuroprotector en el envejecimiento auditivo. Concretamente, la suplementación con omega-3 provoca una menor activación proteica en la vía de JNK. Por el contrario, la ausencia de suplemento conduce a un aumento de la muerte celular, de la expresión de

citoquinas pro-inflamatorias y del estrés oxidativo, así como al descenso en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias.

7. El incremento en la eliminación de Hcy a través de la vía de la transulfuración observado en las cócleas del grupo control, se compensa con la dieta suplementada en omega-3 mediante el incremento en la remetilación por BHMT con el fin de preservar el flujo a través del ciclo de la metionina y los niveles de homocisteinilación proteica normales.
8. Los resultados obtenidos en el trabajo aquí presentado apuntan al papel clave de la BHMT en la regulación de los niveles de Hcy en la cóclea.

CONCLUSIONS

1. Folate deficiency causes hyperhomocysteinemia and hearing loss. These data suggests that nutritional intervention for the control of homocysteine levels could be a new path to prevent hearing loss and, points to homocysteine as a possible early marker of hearing damage.
2. The mouse cochlea shows a gene expression and enzymes pattern of the methionine cycle specific of extrahepatic tissues with some particular characteristics. Specifically: I) *Mtr* and *Bhmt* expression levels remained similar, while *Bhmt2* levels were low; ii) BHMT and AHCY proteins showed altered mobility in comparison with the one described for other tissues.
3. Folic acid deficiency provokes an alteration in the normal expression pattern of the methionine cycle in the cochlea with a decrease in *Ahcy*, *Mtr* and *Bhmt* expression, and AHCY, BHMT and CBS protein levels, alongside an increase in ADA protein levels and local protein integration of Hcy. These changes point to a decrease in homocysteine synthesis, as well as in the remethylation and the transsulfuration pathways, ultimately leading to a decrease in H₂S production and, therefore, to a reduced protection of the stria vascularis.
4. The insufficient intake of folic acid in the diet leads to an imbalance of the oxidative stress in the cochlea. This imbalance is evidenced by i) an increase in p22phox and MnSOD protein levels, in GSH and GSSG metabolites, and in the nitrosative stress marker 3-NT, together with, ii) a decrease in mRNA levels of *Cat*, *Gpx4* and *Gss*.
5. The supplementation with omega-3 fatty acids leads to a delay in age related hearing loss.
6. Omega-3 fatty acids have an anti-inflammatory and neuroprotective role in the ageing of the auditory system. Specifically, omega-3 supplementation causes a decrease in the activation of the JNK signaling pathway. On the contrary, the absence of omega-3 supplementation leads to an increase of cell death, pro-

inflammatory cytokines and oxidative stress, as well as to a decrease in the expression of anti-inflammatory cytokines.

7. The increased Hcy elimination through transsulfuration observed in the control group's cochleae is compensated by the omega-3 diet through increased BHMT remethylation in order to preserve the flux through the methionine cycle and the protein homocysteinylation levels within normality.
8. Altogether, the results obtained from the work presented here suggest that BHMT has a key role in the regulation of Hcy levels in the cochlea.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Hachem, R.N., Zine, A. & Van De Water, T.R. (2010) The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotectives strategies. *Recent Pat CNS Drug Discov*, **5**, 147-163.
- Abribat, T., Nedelec, B., Jobin, N. & Garrel, D.R. (2000) Decreased serum insulin-like growth factor-I in burn patients: relationship with serum insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis and the influence of lipid composition in nutritional support. *Crit Care Med*, **28**, 2366-2372.
- Aburto, M.R., Magarinos, M., Leon, Y., Varela-Nieto, I. & Sanchez-Calderon, H. (2012) AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors. *PLoS One*, **7**, e30790.
- Acmg (2002) Genetics Evaluation Guidelines for the Etiologic Diagnosis of Congenital Hearing Loss. Genetic Evaluation of Congenital Hearing Loss Expert Panel. ACMG statement. *Genet Med*, **4**, 162-171.
- Achon, M., Alonso-Aperts, E. & Varela-Moreiras, G. (2002) High dietary folate supplementation: effects on diet utilization and methionine metabolism in aged rats. *J Nutr Health Aging*, **6**, 51-54.
- Agbor, L.N., Walsh, M.T., Boberg, J.R. & Walker, M.K. (2012) Elevated blood pressure in cytochrome P4501A1 knockout mice is associated with reduced vasodilation to omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Toxicol Appl Pharmacol*, **264**, 351-360.
- Ahmed, A.A., Balogun, K.A., Bykova, N.V. & Cheema, S.K. (2014) Novel regulatory roles of omega-3 fatty acids in metabolic pathways: a proteomics approach. *Nutr Metab (Lond)*, **11**, 6.
- Angier, R.B., Boothe, J.H., Hutchings, B.L., Mowat, J.H., Semb, J., Stokstad, E.L., Subbarow, Y., Waller, C.W., Cosulich, D.B., Fahrenbach, M.J., Hultquist, M.E., Kuh, E., Northey, E.H., Seeger, D.R., Sickels, J.P. & Smith, J.M., Jr. (1945) Synthesis of a Compound Identical with the L. Casei Factor Isolated from Liver. *Science*, **102**, 227-228.
- Angier, R.B., Boothe, J.H., Hutchings, B.L., Mowat, J.H., Semb, J., Stokstad, E.L., Subbarow, Y., Waller, C.W., Cosulich, D.B., Fahrenbach, M.J., Hultquist, M.E., Kuh, E., Northey, E.H., Seeger, D.R., Sickels, J.P. & Smith, J.M., Jr. (1946) The Structure and Synthesis of the Liver L. casei Factor. *Science*, **103**, 667-669.

- Antony, A. (2011) Megaloblastic anemias. In Goldman L, S.A. (ed) *Goldman's Cecil Medicine*. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Antony, A.C. (1992) The biological chemistry of folate receptors. *Blood*, **79**, 2807-2820.
- Arterburn, L.M., Hall, E.B. & Oken, H. (2006) Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, **83**, 1467S-1476S.
- Asami-Miyagishi, R., Iseki, S., Usui, M., Uchida, K., Kubo, H. & Morita, I. (2004) Expression and function of PPARgamma in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 497-501.
- Aslinia, F., Mazza, J.J. & Yale, S.H. (2006) Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clin Med Res*, **4**, 236-241.
- Attias, J., Raveh, E., Aizer-Dannon, A., Bloch-Mimouni, A. & Fattal-Valevski, A. (2012) Auditory system dysfunction due to infantile thiamine deficiency: long-term auditory sequelae. *Audiol Neurootol*, **17**, 309-320.
- Babcock, T.A., Kurland, A., Helton, W.S., Rahman, A., Anwar, K.N. & Espat, N.J. (2003) Inhibition of activator protein-1 transcription factor activation by omega-3 fatty acid modulation of mitogen-activated protein kinase signaling kinases. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **27**, 176-180; discussion 181.
- Babin, P.J. & Gibbons, G.F. (2009) The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a "spandrel" of hepatic lipid metabolism? *Prog Lipid Res*, **48**, 73-91.
- Bailey, L. & Caudill, M. (2013) *Folate*. Wiley-Blackwell, Washington, D.C. USA.
- Bailey, L.B. (2009) *Folate in Health and Disease, Second Edition*. Taylor & Francis.
- Bailey, L.B. & Caudill, M.A. (2012) Folate. In J. W. Erdman, I.A.M.a.S.H.Z. (ed) *Present Knowledge in Nutrition*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Baldie, G., Kaimakamis, D. & Rotondo, D. (1993) Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells. *Biochim Biophys Acta*, **1179**, 125-133.
- Banerjee, R. (2012) Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism. *J Biol Chem*, **287**, 4397-4402.
- Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M. & Krause, K.H. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*, **279**, 46065-46072.

- Bhattacharya, A., Sun, D., Rahman, M. & Fernandes, G. (2007) Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. *J Nutr Biochem*, **18**, 23-30.
- Bills, N.D., Koury, M.J., Clifford, A.J. & Dessypris, E.N. (1992) Ineffective hematopoiesis in folate-deficient mice. *Blood*, **79**, 2273-2280.
- Bjerregaard, P. & Dyerberg, J. (1988a) Fish oil and ischaemic heart disease in Greenland. *Lancet*, **2**, 514.
- Bjerregaard, P. & Dyerberg, J. (1988b) Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *Int J Epidemiol*, **17**, 514-519.
- Bjorndal, B., Strand, E., Gjerde, J., Bohov, P., Svardal, A., Diehl, B.W., Innis, S.M., Berger, A. & Berge, R.K. (2014) Phospholipids from herring roe improve plasma lipids and glucose tolerance in healthy, young adults. *Lipids Health Dis*, **13**, 82.
- Blackburn, H. (1986) The low risk coronary male. *Am J Cardiol*, **58**, 161.
- Blom, H.J., Shaw, G.M., den Heijer, M. & Finnell, R.H. (2006) Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 724-731.
- Bonnet, N. & Ferrari, S.L. (2011) Effects of long-term supplementation with omega-3 fatty acids on longitudinal changes in bone mass and microstructure in mice. *J Nutr Biochem*, **22**, 665-672.
- Borg, E., Canlon, B. & Engstrom, B. (1995) Noise-induced hearing loss. Literature review and experiments in rabbits. Morphological and electrophysiological features, exposure parameters and temporal factors, variability and interactions. *Scand Audiol Suppl*, **40**, 1-147.
- Boulay, A.C., del Castillo, F.J., Giraudet, F., Hamard, G., Giaume, C., Petit, C., Avan, P. & Cohen-Salmon, M. (2013) Hearing is normal without connexin30. *J Neurosci*, **33**, 430-434.
- Bouwens, M., van de Rest, O., Dellschaft, N., Bromhaar, M.G., de Groot, L.C., Geleijnse, J.M., Muller, M. & Afman, L.A. (2009) Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*, **90**, 415-424.
- Buchowski, M.S., Hongu, N., Acra, S., Wang, L., Warolin, J. & Roberts, L.J., 2nd (2012) Effect of modest caloric restriction on oxidative stress in women, a randomized trial. *PLoS One*, **7**, e47079.

- Burr, G.O. & Burr, M. (1930) On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Progress in Lipid Research*, **20**, xxi.
- Burr, G.O. & Burr, M.M. (1929) A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem*, **82**, 345-367.
- Cadoni, G., Agostino, S., Scipione, S. & Galli, J. (2004) Low serum folate levels: a risk factor for sudden sensorineural hearing loss? *Acta Otolaryngol*, **124**, 608-611.
- Calder, P.C. (2004) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*, **107**, 1-11.
- Calder, P.C. (2009) Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *Int Rev Immunol*, **28**, 506-534.
- Calder, P.C. (2010) Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*, **2**, 355-374.
- Calder, P.C. (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*, **75**, 645-662.
- Calder, P.C. (2014) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. En prensa.
- Camarero, G., Avendano, C., Fernandez-Moreno, C., Villar, A., Contreras, J., de Pablo, F., Pichel, J.G. & Varela-Nieto, I. (2001) Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci*, **21**, 7630-7641.
- Camilo, E., Zimmerman, J., Mason, J.B., Golner, B., Russell, R., Selhub, J. & Rosenberg, I.H. (1996) Folate synthesized by bacteria in the human upper small intestine is assimilated by the host. *Gastroenterology*, **110**, 991-998.
- Campbell, T.W. (2012) Mammalian hematology: laboratory animals and miscellaneous species. . In Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R. (eds) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Wiley.
- Canaan, S., Riviere, M., Verger, R. & Dupuis, L. (1999a) The cysteine residues of recombinant human gastric lipase. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 851-854.
- Canaan, S., Roussel, A., Verger, R. & Cambillau, C. (1999b) Gastric lipase: crystal structure and activity. *Biochim Biophys Acta*, **1441**, 197-204.
- Canellos, G.P., Mead, J.A., Greenberg, N.H. & Schrecker, A.W. (1967) The effect of treatment with cytotoxic agents on mouse spleen dihydrofolate reductase activity. *Cancer Res*, **27**, 784-788.

- Castillero, E., Lopez-Menduina, M., Martin, A.I., Villanua, M.A. & Lopez-Calderon, A. (2011) Comparison of the effects of the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic and fenofibrate on the inhibitory effect of arthritis on IGF1. *J Endocrinol*, **210**, 361-368.
- Cediel, R., Riquelme, R., Contreras, J., Diaz, A. & Varela-Nieto, I. (2006) Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci*, **23**, 587-590.
- Chadwick, L.H., McCandless, S.E., Silverman, G.L., Schwartz, S., Westaway, D. & Nadeau, J.H. (2000) Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics*, **70**, 66-73.
- Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L. & Ueland, P.M. (1998) Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*, **55**, 1449-1455.
- Cobo Parra, P., Varela Nieto, I., Murillo Cuesta, S., Martínez Vega, R., Novares, R. & Cediel Algovía, R. (2012) Cámara de registro para ensayos auditivos con pequeños animales *CSIC-UCM*, Spain, pp. 15.
- Cohen-Salmon, M., Regnault, B., Cayet, N., Caille, D., Demuth, K., Hardelin, J.P., Janel, N., Meda, P. & Petit, C. (2007) Connexin30 deficiency causes intrastrial fluid-blood barrier disruption within the cochlear stria vascularis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6229-6234.
- Cooper, A.D. (1997) Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*, **38**, 2173-2192.
- Corpas Cobisa, E. (1993) [Growth hormone and human aging]. *An Med Interna*, **10 Suppl**, 15-18.
- Corpas, E., Harman, S.M. & Blackman, M.R. (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev*, **14**, 20-39.
- Corwin, J.T. & Cotanche, D.A. (1988) Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science*, **240**, 1772-1774.
- Cox, E.V., Meynell, M.J. & Cooke, W.T. (1961) Folic acid deficiency. *Postgrad Med J*, **37**, 252-256.
- Craciunescu, C.N., Brown, E.C., Mar, M.H., Albright, C.D., Nadeau, M.R. & Zeisel, S.H. (2004) Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr*, **134**, 162-166.

- Cruz, R.M., Lambert, P.R. & Rubel, E.W. (1987) Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **113**, 1058-1062.
- Cutler, R.G. (2005) Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. *Rejuvenation Res*, **8**, 138-140.
- Cheshire, J.L. & Baldwin, A.S., Jr. (1997) Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation. *Mol Cell Biol*, **17**, 6746-6754.
- Chu, A.J., Walton, M.A., Prasad, J.K. & Seto, A. (1999) Blockade by polyunsaturated n-3 fatty acids of endotoxin-induced monocytic tissue factor activation is mediated by the depressed receptor expression in THP-1 cells. *J Surg Res*, **87**, 217-224.
- Church, M.W., Jen, K.L., Anumba, J.I., Jackson, D.A., Adams, B.R. & Hotra, J.W. (2010) Excess omega-3 fatty acid consumption by mothers during pregnancy and lactation caused shorter life span and abnormal ABRs in old adult offspring. *Neurotoxicol Teratol*, **32**, 171-181.
- Church, M.W., Jen, K.L., Jackson, D.A., Adams, B.R. & Hotra, J.W. (2009) Abnormal neurological responses in young adult offspring caused by excess omega-3 fatty acid (fish oil) consumption by the mother during pregnancy and lactation. *Neurotoxicol Teratol*, **31**, 26-33.
- Danielpour, D. & Song, K. (2006) Cross-talk between IGF-I and TGF-beta signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 59-74.
- Dauncey, M.J. (2014) Nutrition, the brain and cognitive decline: insights from epigenetics. *Eur J Clin Nutr*.
- Davidson, L.S. & Girdwood, R.H. (1947) Folic acid as a therapeutic agent. *Br Med J*, **1**, 587-591.
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
- de Antueno, R.J., Allen, S.J., Ponton, A. & Winther, M.D. (2001) Activity and mRNA abundance of Delta-5 and Delta-6 fatty acid desaturases in two human cell lines. *FEBS Lett*, **491**, 247-251.
- DeCarlo, C.A., Tuokko, H.A., Williams, D., Dixon, R.A. & MacDonald, S.W. (2014) BioAge: Toward a multi-determined, mechanistic account of cognitive aging. *Ageing Res Rev*, **18C**, 95-105.

- Delgado, M., Garrido, F., Perez-Miguelsanz, J., Pacheco, M., Partearroyo, T., Perez-Sala, D. & Pajares, M.A. (2014) Acute liver injury induces nucleocytoplasmic redistribution of hepatic methionine metabolism enzymes. *Antioxid Redox Signal*, **20**, 2541-2554.
- Delgado, M., Perez-Miguelsanz, J., Garrido, F., Rodriguez-Tarduchy, G., Perez-Sala, D. & Pajares, M.A. (2008) Early effects of copper accumulation on methionine metabolism. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2080-2090.
- DeLong, C.J., Shen, Y.J., Thomas, M.J. & Cui, Z. (1999) Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J Biol Chem*, **274**, 29683-29688.
- Dewailly, E., Blanchet, C., Lemieux, S., Sauve, L., Gingras, S., Ayotte, P. & Holub, B.J. (2001) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. *Am J Clin Nutr*, **74**, 464-473.
- Draper, E., Reynolds, C.M., Canavan, M., Mills, K.H., Loscher, C.E. & Roche, H.M. (2011) Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF-kappaB independent of PPARgamma. *J Nutr Biochem*, **22**, 784-790.
- Dror, A.A. & Avraham, K.B. (2009) Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. *Annu Rev Genet*, **43**, 411-437.
- Dullemeijer, C., Verhoef, P., Brouwer, I.A., Kok, F.J., Brummer, R.J. & Durga, J. (2010) Plasma very long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and age-related hearing loss in older adults. *J Nutr Health Aging*, **14**, 347-351.
- Durga, J., Anteunis, L.J., Schouten, E.G., Bots, M.L., Kok, F.J. & Verhoef, P. (2006) Association of folate with hearing is dependent on the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation. *Neurobiol Aging*, **27**, 482-489.
- Durga, J., Verhoef, P., Anteunis, L.J., Schouten, E. & Kok, F.J. (2007) Effects of folic acid supplementation on hearing in older adults: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, **146**, 1-9.
- Ehret, G. & Frankenreiter, M. (1977) Quantitative analysis of cochlear structures in the house mouse in relation to mechanisms of acoustical information processing. *Journal of comparative physiology*, **122**, 65-85.
- Ellis, E.F., Police, R.J., Yancey, L.M., Grabeel, M.N., Heizer, M.L. & Holt, S.A. (1990) Effect of fish oil n-3 fatty acids on cerebral microcirculation. *Am J Physiol*, **258**, H1780-1785.

- Emmett, S.D. & West, K.P., Jr. (2014) Gestational vitamin A deficiency: A novel cause of sensorineural hearing loss in the developing world? *Med Hypotheses*, **82**, 6-10.
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.W., Cannon, J.G., Rogers, T.S., Klempner, M.S., Weber, P.C. & et al. (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, **320**, 265-271.
- Endres, S., Eisenhut, T. & Sinha, B. (1995) n-3 polyunsaturated fatty acids in the regulation of human cytokine synthesis. *Biochem Soc Trans*, **23**, 277-281.
- Erdman, J.W., MacDonald, I.A. & Zeisel, S.H. (2012) *Present Knowledge in Nutrition*. Wiley.
- Erkkila, A., de Mello, V.D., Riserus, U. & Laaksonen, D.E. (2008) Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. *Prog Lipid Res*, **47**, 172-187.
- Evans, P. & Halliwell, B. (1999) Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci*, **884**, 19-40.
- Everds, N. (2006) Hematology of the laboratory mouse. In Fox, J.G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., Smith, A. (eds) *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models*. Elsevier Science.
- FAO, W. (1995) WHO and FAO joint consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev*, **53**, 202-205.
- Fennema, O.R. (2000) *Química de los alimentos*. Acribia.
- Fernandes, G., Bhattacharya, A., Rahman, M., Zaman, K. & Banu, J. (2008) Effects of n-3 fatty acids on autoimmunity and osteoporosis. *Front Biosci*, **13**, 4015-4020.
- Finkelstein, J.D. (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr*, **157 Suppl 2**, S40-44.
- Finkelstein, J.D. & Martin, J.J. (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem*, **259**, 9508-9513.
- Fisher, M., Levine, P.H., Weiner, B.H., Johnson, M.H., Doyle, E.M., Ellis, P.A. & Hoogasian, J.J. (1990) Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. *Am J Clin Nutr*, **51**, 804-808.

- Fleischer, G. (1978) Evolutionary principles of the mammalian middle ear. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, **55**, 3-70.
- Fletcher, J.R. (1993) Eicosanoids. Critical agents in the physiological process and cellular injury. *Arch Surg*, **128**, 1192-1196.
- Fusconi, M., Chistolini, A., de Virgilio, A., Greco, A., Massaro, F., Turchetta, R., Benincasa, A.T., Tombolini, M. & de Vincentiis, M. (2012) Sudden sensorineural hearing loss: a vascular cause? Analysis of prothrombotic risk factors in head and neck. *Int J Audiol*, **51**, 800-805.
- Gates, G.A., Cobb, J.L., D'Agostino, R.B. & Wolf, P.A. (1993) The relation of hearing in the elderly to the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **119**, 156-161.
- Gates, G.A. & Cooper, J.C. (1991) Incidence of hearing decline in the elderly. *Acta Otolaryngol*, **111**, 240-248.
- Gates, G.A. & Mills, J.H. (2005) Presbycusis. *Lancet*, **366**, 1111-1120.
- Ge, Z., Ma, S., Jia, X., Zhang, L. & Song, L. (2014) [Study of protective effects on noise-induced hearing impairment by D-methionine tablets pre-loading]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, **28**, 1232-1234.
- Gelfand, S.A. & Gelfand, S. (2004) *Hearing: An Introduction to Psychological and Physiological Acoustics, Fourth Edition*. Taylor & Francis.
- Geng, Y., Valbracht, J. & Lotz, M. (1996) Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest*, **98**, 2425-2430.
- German, O.L., Monaco, S., Agnolazza, D.L., Rotstein, N.P. & Politi, L.E. (2013) Retinoid X receptor activation is essential for docosahexaenoic acid protection of retina photoreceptors. *J Lipid Res*, **54**, 2236-2246.
- Godbout, J.P. & Johnson, R.W. (2004) Interleukin-6 in the aging brain. *J Neuroimmunol*, **147**, 141-144.
- Gok, U., Halifeoglu, I., Canatan, H., Yildiz, M., Gursu, M.F. & Gur, B. (2004) Comparative analysis of serum homocysteine, folic acid and Vitamin B12 levels in patients with noise-induced hearing loss. *Auris Nasus Larynx*, **31**, 19-22.
- Gonzalez, B., Campillo, N., Garrido, F., Gasset, M., Sanz-Aparicio, J. & Pajares, M.A. (2003) Active-site-mutagenesis study of rat liver betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Biochem J*, **370**, 945-952.

- Gonzalez, B., Garrido, F., Ortega, R., Martinez-Julvez, M., Revilla-Guarinos, A., Perez-Pertejo, Y., Velazquez-Campoy, A., Sanz-Aparicio, J. & Pajares, M.A. (2012) NADP+ binding to the regulatory subunit of methionine adenosyltransferase II increases intersubunit binding affinity in the hetero-trimer. *PLoS One*, **7**, e50329.
- Gopinath, B., Flood, V.M., Rochtchina, E., McMahon, C.M. & Mitchell, P. (2010) Consumption of omega-3 fatty acids and fish and risk of age-related hearing loss. *Am J Clin Nutr*, **92**, 416-421.
- Gratton, M.A. & Schulte, B.A. (1995) Alterations in microvasculature are associated with atrophy of the stria vascularis in quiet-aged gerbils. *Hear Res*, **82**, 44-52.
- Grimm, H., Tibell, A., Norrlind, B., Blecher, C., Wilker, S. & Schwemmler, K. (1994) Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **18**, 417-421.
- Grimminger, F., Wahn, H., Kramer, H.J., Stevens, J., Mayer, K., Walmrath, D. & Seeger, W. (1995) Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, **268**, H2252-2259.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**, 2195-2224.
- Hepner, G.W., Booth, C.C., Cowan, J., Hoffbrand, A.V. & Mollin, D.L. (1968) Absorption of crystalline folic acid in man. *Lancet*, **2**, 302-306.
- Hequembourg, S. & Liberman, M.C. (2001) Spiral ligament pathology: a major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *J Assoc Res Otolaryngol*, **2**, 118-129.
- Herbert, V. (1967) Biochemical and hematologic lesions in folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr*, **20**, 562-572.
- Herbert, V. (1968) Folic acid deficiency in man. *Vitam Horm*, **26**, 525-538.
- Herbert, V. & Das, K. (1993) Folic acid and vitamin B12. In ME., S., JA., O., Shike M (eds) *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lea and Fabiger, Philadelphia.
- Hibbard, B.M. (1964) The Role of Folic Acid in Pregnancy; with Particular Reference to Anaemia, Abruptio and Abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, **71**, 529-542.
- Hirai, A., Terano, T., Tamura, Y. & Yoshida, S. (1989) Eicosapentaenoic acid and adult diseases in Japan: epidemiological and clinical aspects. *J Intern Med Suppl*, **731**, 69-75.

- Hoffbrand, A.V., Tabaqchali, S., Booth, C.C. & Mollin, D.L. (1971) Small intestinal bacterial flora and folate status in gastrointestinal disease. *Gut*, **12**, 27-33.
- Hoffbrand, A.V. & Weir, D.G. (2001) The history of folic acid. *Br J Haematol*, **113**, 579-589.
- Holman, R.T. (1964) Nutritional and Metabolic Interrelationships between Fatty Acids. *Fed Proc*, **23**, 1062-1067.
- Holman, R.T., Johnson, S.B. & Hatch, T.F. (1982) A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*, **35**, 617-623.
- Holman, R.T. (1998) The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr*, **128**, 427S-433S.
- Holmboe-Ottesen, G. & Wandel, M. (2012) Changes in dietary habits after migration and consequences for health: a focus on South Asians in Europe. *Food Nutr Res*, **56**.
- Hornbeck, P.V., Kornhauser, J.M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V. & Sullivan, M. (2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res*, **40**, D261-270.
- Horne, D., Krumdieck, C. & Wagner, C. (1981) Properties of folic acid gamma-glutamyl hydrolase (conjugase) in rat bile and. **111**, 442-449.
- Horne, D.W., Briggs, W.T. & Wagner, C. (1978) Transport of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in freshly isolated hepatocytes. *J Biol Chem*, **253**, 3529-3535.
- Horne, D.W. & Patterson, D. (1988) Lactobacillus casei microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clin Chem*, **34**, 2357-2359.
- Houston, D.K., Johnson, M.A., Nozza, R.J., Gunter, E.W., Shea, K.J., Cutler, G.M. & Edmonds, J.T. (1999) Age-related hearing loss, vitamin B-12, and folate in elderly women. *Am J Clin Nutr*, **69**, 564-571.
- Huang, T., Hu, X., Khan, N., Yang, J. & Li, D. (2013) Effect of polyunsaturated fatty acids on homocysteine metabolism through regulating the gene expressions involved in methionine metabolism. *ScientificWorldJournal*, **2013**, 931626.
- Huang, T., Wahlqvist, M.L. & Li, D. (2010) Docosahexaenoic acid decreases plasma homocysteine via regulating enzyme activity and mRNA expression involved in methionine metabolism. *Nutrition*, **26**, 112-119.

- Huang, T., Wahlqvist, M.L. & Li, D. (2012) Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid on gene expression of the critical enzymes involved in homocysteine metabolism. *Nutr J*, **11**, 6.
- Huang, T., Zheng, J., Chen, Y., Yang, B., Wahlqvist, M.L. & Li, D. (2011) High consumption of Omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease plasma homocysteine: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Nutrition*, **27**, 863-867.
- Hurst, S., Zainal, Z., Caterson, B., Hughes, C.E. & Harwood, J.L. (2010) Dietary fatty acids and arthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **82**, 315-318.
- Hyun, T.H. & Tamura, T. (2005) Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Exp Biol Med (Maywood)*, **230**, 444-454.
- Im, D.S. (2012) Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Prog Lipid Res*, **51**, 232-237.
- Ingenbleek, Y. & Kimura, H. (2013) Nutritional essentiality of sulfur in health and disease. *Nutr Rev*, **71**, 413-432.
- Jacono, A.A., Hu, B., Kopke, R.D., Henderson, D., Van De Water, T.R. & Steinman, H.M. (1998) Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla. *Hear Res*, **117**, 31-38.
- Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Wilson, P.W. & Rosenberg, I.H. (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med*, **340**, 1449-1454.
- Jakubowski, H. & Glowacki, R. (2011) Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem*, **55**, 81-103.
- Jewett, D.L. & Williston, J.S. (1971) Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. *Brain*, **94**, 681-696.
- Jiang, H., Talaska, A.E., Schacht, J. & Sha, S.H. (2007) Oxidative imbalance in the aging inner ear. *Neurobiol Aging*, **28**, 1605-1612.
- Johnsson, L.G. & Hawkins, J.E., Jr. (1972) Vascular changes in the human inner ear associated with aging. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **81**, 364-376.
- Kabil, O., Motl, N. & Banerjee, R. (2014a) H₂S and its role in redox signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1844**, 1355-1366.

- Kabil, O., Vitvitsky, V. & Banerjee, R. (2014b) Sulfur as a signaling nutrient through hydrogen sulfide. *Annu Rev Nutr*, **34**, 171-205.
- Karli, R., Gul, A. & Ugur, B. (2013) Effect of vitamin B12 deficiency on otoacoustic emissions. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, **33**, 243-247.
- Keithley, E.M., Canto, C., Zheng, Q.Y., Wang, X., Fischel-Ghodsian, N. & Johnson, K.R. (2005) Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear Res*, **209**, 76-85.
- Kim, J., Cho, H.J., Sagong, B., Kim, S.J., Lee, J.T., So, H.S., Lee, I.K., Kim, U.K., Lee, K.Y. & Choo, Y.S. (2014) Alpha-lipoic acid protects against cisplatin-induced ototoxicity via the regulation of MAPKs and proinflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, **449**, 183-189.
- Klipstein, F.A. & Lipton, S.D. (1970) Intestinal flora of folate-deficient mice. *Am J Clin Nutr*, **23**, 132-140.
- König, H., Liebich, H. & Bragulla, H. (2007) *Vestibulocochlear Organ*. Schattauer, New York
- Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G. & Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, **11**, 779-791.
- Kromann, N. & Green, A. (1980) Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*, **208**, 401-406.
- Kromhout, D. (2012) Omega-3 fatty acids and coronary heart disease. The final verdict? *Curr Opin Lipidol*, **23**, 554-559.
- Krstic, R. (1991) *Sensory Systems*. Springer Berlin Heidelberg, Tokyo, Japan.
- Kubota, H., Matsumoto, H., Higashida, M., Murakami, H., Nakashima, H., Oka, Y., Okumura, H., Yamamura, M., Nakamura, M. & Hirai, T. (2013) Eicosapentaenoic acid modifies cytokine activity and inhibits cell proliferation in an oesophageal cancer cell line. *Anticancer Res*, **33**, 4319-4324.
- Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci*, **29**, 14077-14085.

- Kulkarni, A., Dangat, K., Kale, A., Sable, P., Chavan-Gautam, P. & Joshi, S. (2011) Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One*, **6**, e17706.
- Kundu, S., Munjal, C., Tyagi, N., Sen, U., Tyagi, A.C. & Tyagi, S.C. (2012) Folic acid improves inner ear vascularization in hyperhomocysteinemic mice. *Hear Res*, **284**, 42-51.
- Kundu, S., Tyagi, N., Sen, U. & Tyagi, S.C. (2009) Matrix imbalance by inducing expression of metalloproteinase and oxidative stress in cochlea of hyperhomocysteinemic mice. *Mol Cell Biochem*, **332**, 215-224.
- Lambeth, J.D. & Neish, A.S. (2014) Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol*, **24**, 119-145.
- Lamm, K. & Arnold, W. (1998) The effect of prednisolone and non-steroidal anti-inflammatory agents on the normal and noise-damaged guinea pig inner ear. *Hear Res*, **115**, 149-161.
- Lands, W.E. (1992) Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *FASEB J*, **6**, 2530-2536.
- Lasisi, A.O., Fehintola, F.A. & Yusuf, O.B. (2010) Age-related hearing loss, vitamin B12, and folate in the elderly. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **143**, 826-830.
- Lautermann, J., Crann, S.A., McLaren, J. & Schacht, J. (1997) Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear Res*, **114**, 75-82.
- Lawrence, G.D. (2010) The fats of life [essential fatty acids in health and disease *EBSCO Academic eBook Collection Complete*. Rutgers University Press,, New Brunswick, N.J., pp. xvi, 277 p.
- LeMasurier, M. & Gillespie, P.G. (2005) Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron*, **48**, 403-415.
- Lewis, R.A., Austen, K.F. & Soberman, R.J. (1990) Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med*, **323**, 645-655.
- Li-Korotky, H.S. (2012) Age-related hearing loss: quality of care for quality of life. *Gerontologist*, **52**, 265-271.
- Li, H.S. & Borg, E. (1991) Age-related loss of auditory sensitivity in two mouse genotypes. *Acta Otolaryngol*, **111**, 827-834.

- Li, H.S., Hulcrantz, M. & Borg, E. (1993) Influence of age on noise-induced permanent threshold shifts in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Audiology*, **32**, 195-204.
- Li, X., Mao, X.B., Hei, R.Y., Zhang, Z.B., Wen, L.T., Zhang, P.Z., Qiu, J.H. & Qiao, L. (2011) Protective role of hydrogen sulfide against noise-induced cochlear damage: a chronic intracochlear infusion model. *PLoS One*, **6**, e26728.
- Lichtenstein, A.H. (2003) Dietary fat and cardiovascular disease risk: quantity or quality? *J Womens Health (Larchmt)*, **12**, 109-114.
- Lin, S., Hou, J., Xiang, F., Zhang, X., Che, L., Lin, Y., Xu, S., Tian, G., Zeng, Q., Yu, B., Zhang, K., Chen, D., Wu, D. & Fang, Z. (2013) Mammary inflammation around parturition appeared to be attenuated by consumption of fish oil rich in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids Health Dis*, **12**, 190.
- Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnelle, D.R. & Stamler, J.S. (1997) Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5923-5928.
- Liu, R.M. & Dickinson, D.A. (2003) Decreased synthetic capacity underlies the age-associated decline in glutathione content in Fisher 344 rats. *Antioxid Redox Signal*, **5**, 529-536.
- Liu, X.Z. & Yan, D. (2007) Ageing and hearing loss. *J Pathol*, **211**, 188-197.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lodish, H. & Matsudaira, P. (2000) *Molecular cell biology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Lohse, P., Lohse, P., Chahrokh-Zadeh, S. & Seidel, D. (1997) Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: site-directed mutagenesis of Cys227 and Cys236 results in substrate-dependent reduction of enzymatic activity. *J Lipid Res*, **38**, 1896-1905.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 1194-1217.
- Lu, S.C. (2013) Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, **1830**, 3143-3153.
- Lu, S.C. & Mato, J.M. (2012) S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol Rev*, **92**, 1515-1542.

- Lucock, M. (2000) Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*, **71**, 121-138.
- Luostarinen, R. & Saldeen, T. (1996) Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **55**, 167-172.
- MacDonald, S.W., Dixon, R.A., Cohen, A.L. & Hazlitt, J.E. (2004) Biological age and 12-year cognitive change in older adults: findings from the Victoria Longitudinal Study. *Gerontology*, **50**, 64-81.
- MacGregor, J.T., Schlegel, R., Wehr, C.M., Alperin, P. & Ames, B.N. (1990) Cytogenetic damage induced by folate deficiency in mice is enhanced by caffeine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9962-9965.
- Maeda, Y., Fukushima, K., Omichi, R., Kariya, S. & Nishizaki, K. (2013) Time courses of changes in phospho- and total- MAP kinases in the cochlea after intense noise exposure. *PLoS One*, **8**, e58775.
- Maestro-de-las-Casas, C., Perez-Miguelsanz, J., Lopez-Gordillo, Y., Maldonado, E., Partearroyo, T., Varela-Moreiras, G. & Martinez-Alvarez, C. (2013) Maternal folic acid-deficient diet causes congenital malformations in the mouse eye. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **97**, 587-596.
- Mahmood, G., Mei, Z., Hojjat, H., Pace, E., Kallakuri, S. & Zhang, J.S. (2014) Therapeutic effect of sildenafil on blast-induced tinnitus and auditory impairment. *Neuroscience*, **269**, 367-382.
- Makishima, K. (1978) Arteriolar sclerosis as a cause of presbycusis. *Otolaryngology*, **86**, ORL322-326.
- Marchioli, R. (1999) Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data. *Pharmacol Res*, **40**, 227-238.
- Martin, G.K., Stagner, B.B. & Lonsbury-Martin, B.L. (2006) Assessment of cochlear function in mice: distortion-product otoacoustic emissions. *Curr Protoc Neurosci*, **Chapter 8**, Unit8 21C.
- Matsui, J.I., Gale, J.E. & Warchol, M.E. (2004) Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J Neurobiol*, **61**, 250-266.

- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Kempf, C.R., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Stivala, F., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., Basecke, J., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Montalto, G., Cervello, M., Cocco, L. & Martelli, A.M. (2011) Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. *J Cell Physiol*, **226**, 2762-2781.
- McEwen, B., Morel-Kopp, M.C., Tofler, G. & Ward, C. (2010) Effect of omega-3 fish oil on cardiovascular risk in diabetes. *Diabetes Educ*, **36**, 565-584.
- Mehta, L.R., Dworkin, R.H. & Schwid, S.R. (2009) Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*, **5**, 82-92.
- Melikian, V., Paton, A., Leeming, R.J. & Portman-Graham, H. (1971) Site of reduction and methylation of folic acid in man. *Lancet*, **2**, 955-957.
- Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I.P., Yi, P. & James, S.J. (2000) Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate concentrations. *Clin Chem*, **46**, 265-272.
- Merchan Cifuentes, M. (1983) *El Oído Interno: Ultraestructura, Embriogénesis y algunos aspectos Patológicos*. Ediciones Universidad de Salamanca, Universidad de Salamanca, Spain.
- Milton, N.G.N. (2008) Homocysteine Inhibits Hydrogen Peroxide Breakdown by Catalase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, **1**, 34-41.
- Miller, J.W. (2000) Homocysteine, Alzheimer's disease, and cognitive function. *Nutrition*, **16**, 675-677.
- Mitchell, H.K., Snell, E.E. & Williams, R.J. (1941) The concentration of "folic acid" *Journal of the American Chemical Society*, **63**, 1.
- Möller, A. (2006) Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system. Academic Press, Amsterdam ; Boston, pp. 309 p.
- Moon, H.J., Kim, T.H., Byun, D.W. & Park, Y. (2012) Positive correlation between erythrocyte levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and bone mass in postmenopausal Korean women with osteoporosis. *Ann Nutr Metab*, **60**, 146-153.
- Moore, B.C.J. (2008) Physiological Aspects of Cochlear Hearing Loss *Cochlear Hearing Loss*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1-37.
- Moraes, L.A., Piqueras, L. & Bishop-Bailey, D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, **110**, 371-385.

- Mori, T.A. (2014) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: epidemiology and effects on cardiometabolic risk factors. *Food Funct*, **5**, 2004-2019.
- Morgan, D.R., Dixon, L.J., Hanratty, C.G., El-Sherbeeney, N., Hamilton, P.B., McGrath, L.T., Leahey, W.J., Johnston, G.D. & McVeigh, G.E. (2006) Effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on endothelium-dependent vasodilation in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*, **97**, 547-551.
- Mosharov, E., Cranford, M.R. & Banerjee, R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*, **39**, 13005-13011.
- Mu, H. & Hoy, C.E. (2004) The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, **43**, 105-133.
- Mudd, S.H., Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., Jacobs, R.L., Stabler, S.P., Allen, R.H., Vance, D.E. & Wagner, C. (2007) Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. *Am J Clin Nutr*, **85**, 19-25.
- Muller, M., von Hunerbein, K., Hoidis, S. & Smolders, J.W. (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res*, **202**, 63-73.
- Murillo-Cuesta, S., Camarero, G., Gonzalez-Rodriguez, A., De La Rosa, L.R., Burks, D.J., Avendano, C., Valverde, A.M. & Varela-Nieto, I. (2012) Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Mol Med*, **18**, 260-269.
- Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-de la Rosa, L., Cediell, R., Lassaletta, L. & Varela-Nieto, I. (2011) The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci*, **4**, 11.
- National Research Council (1995) *Nutrient requirements of the laboratory mouse*. National Academy press, Washington, DC.
- Ngan, E.M. & May, B.J. (2001) Relationship between the auditory brainstem response and auditory nerve thresholds in cats with hearing loss. *Hear Res*, **156**, 44-52.
- Nomura, Y. (2014) Structure of the Inner Ear *Morphological Aspects of Inner Ear Disease*. Springer Japan, pp. 1-22.
- O'Broin, J.D., Temperley, I.J., Brown, J.P. & Scott, J.M. (1975) Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *Am J Clin Nutr*, **28**, 438-444.

- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M. & Olefsky, J.M. (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, **142**, 687-698.
- Ohlemiller, K.K. (2006) Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res*, **1091**, 89-102.
- Ohlemiller, K.K. & Gagnon, P.M. (2004) Apical-to-basal gradients in age-related cochlear degeneration and their relationship to "primary" loss of cochlear neurons. *J Comp Neurol*, **479**, 103-116.
- Ohlemiller, K.K. & Gagnon, P.M. (2007) Genetic dependence of cochlear cells and structures injured by noise. *Hear Res*, **224**, 34-50.
- Ohlemiller, K.K., Rybak Rice, M.E., Rellinger, E.A. & Ortmann, A.J. (2011) Divergence of noise vulnerability in cochleae of young CBA/J and CBA/CAJ mice. *Hear Res*, **272**, 13-20.
- Ou, H.C., Harding, G.W. & Bohne, B.A. (2000) An anatomically based frequency-place map for the mouse cochlea. *Hear Res*, **145**, 123-129.
- Pajares, M.A., Alvarez, L. & Perez-Sala, D. (2013) How are mammalian methionine adenosyltransferases regulated in the liver? A focus on redox stress. *FEBS Lett*, **587**, 1711-1716.
- Pajares, M.A. & Markham, G.D. (2011) Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **78**, 449-521.
- Pajares, M.A. & Perez-Sala, D. (2006) Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2792-2803.
- Parham, K., Sun, X. & Kim, D. (2001) *Noninvasive assessment of auditory function in mice: Auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emissions*. CCR Press LLC, Boca Raton, FL, USA.
- Park, S.K., Yang, W.S., Lee, S.K., Ahn, H., Park, J.S., Hwang, O. & Lee, J.D. (2000) TGF-beta(1) down-regulates inflammatory cytokine-induced VCAM-1 expression in cultured human glomerular endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant*, **15**, 596-604.
- Park, J. & Gupta, R. (2013) Adenosine Metabolism, Adenosine Kinase, and Evolution. In Masino, S., Boison, D. (eds) *Adenosine*. Springer New York, pp. 23-54.

- Partearroyo, T., Ubeda, N., Alonso-Aperte, E. & Varela-Moreiras, G. (2010) Moderate or supranormal folic acid supplementation does not exert a protective effect for homocysteinemia and methylation markers in growing rats. *Ann Nutr Metab*, **56**, 143-151.
- Partearroyo, T., Ubeda, N., Montero, A., Achon, M. & Varela-Moreiras, G. (2013) Vitamin B(12) and folic acid imbalance modifies NK cytotoxicity, lymphocytes B and lymphoproliferation in aged rats. *Nutrients*, **5**, 4836-4848.
- Paterniti, I., Impellizzeri, D., Di Paola, R., Esposito, E., Gladman, S., Yip, P., Priestley, J.V., Michael-Titus, A.T. & Cuzzocrea, S. (2014) Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies. *J Neuroinflammation*, **11**, 6.
- Pentieva, K., McNulty, H., Reichert, R., Ward, M., Strain, J.J., McKillop, D.J., McPartlin, J.M., Connolly, E., Molloy, A., Kramer, K. & Scott, J.M. (2004) The short-term bioavailabilities of [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid are equivalent in men. *J Nutr*, **134**, 580-585.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Piolot, A., Blache, D., Boulet, L., Fortin, L.J., Dubreuil, D., Marcoux, C., Davignon, J. & Lussier-Cacan, S. (2003) Effect of fish oil on LDL oxidation and plasma homocysteine concentrations in health. *J Lab Clin Med*, **141**, 41-49.
- Pirvola, U., Xing-Qun, L., Virkkala, J., Saarma, M., Murakata, C., Camoratto, A.M., Walton, K.M. & Ylikoski, J. (2000) Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci*, **20**, 43-50.
- Poirrier, A.L., Pincemail, J., Van Den Ackerveken, P., Lefebvre, P.P. & Malgrange, B. (2010) Oxidative stress in the cochlea: an update. *Curr Med Chem*, **17**, 3591-3604.
- Prazma, J., Carrasco, V.N., Butler, B., Waters, G., Anderson, T. & Pillsbury, H.C. (1990) Cochlear microcirculation in young and old gerbils. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **116**, 932-936.
- Puel, J.L., Ladrech, S., Chabert, R., Pujol, R. & Eybalin, M. (1991) Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, **51**, 255-264.

- Quintana-Cabrera, R., Fernandez-Fernandez, S., Bobo-Jimenez, V., Escobar, J., Sastre, J., Almeida, A. & Bolanos, J.P. (2012) gamma-Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun*, **3**, 718.
- Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem*, **288**, 26464-26472.
- Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S.K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, **1**, 3159-3165.
- Raphael, Y. & Altschuler, R.A. (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*, **60**, 397-422.
- Raz, Y. & Kelley, M.W. (1999) Retinoic acid signaling is necessary for the development of the organ of Corti.
- Reagan, W.J., Irizarry-Rovira, A., Poitout-Belissent, F., Bolliger, A.P., Ramaiah, S.K., Travlos, G., Walker, D., Bounous, D., Walter, G. & Bone Marrow Working Group of, A.S. (2011) Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Vet Clin Pathol*, **40**, 119-134.
- Reaven, G.M. & Reaven, E.P. (1985) Age, glucose intolerance, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc*, **33**, 286-290.
- Richardson, G.P., Lukashkin, A.N. & Russell, I.J. (2008) The tectorial membrane: one slice of a complex cochlear sandwich. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, **16**, 458-464.
- Rigaudy, J. & Klesney, S.P. (1979) *Nomenclature of organic chemistry*. Pergamon Press, Oxford etc.
- Riquelme, R., Cediél, R., Contreras, J., la Rosa Lourdes, R.D., Murillo-Cuesta, S., Hernandez-Sanchez, C., Zubeldia, J.M., Cerdan, S. & Varela-Nieto, I. (2010) A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor I deficient mice. *Front Neuroanat*, **4**, 27.
- Robinson, D.R., Urakaze, M., Huang, R., Taki, H., Sugiyama, E., Knoell, C.T., Xu, L., Yeh, E.T. & Auron, P.E. (1996) Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 beta gene transcription. *Lipids*, **31 Suppl**, S23-31.
- Rosen, S. & Olin, P. (1965) Hearing loss and coronary heart disease. *Bull N Y Acad Med*, **41**, 1052-1068.

- Rosen, S., Olin, P. & Rosen, H.V. (1970) Dietary prevention of Hearing Loss. *Acta Otolaryngol*, **70**, 242-247.
- Rosowski, J. (2013) Comparative Middle Ear Structure and Function in Vertebrates. In Puria, S., Fay, R.R., Popper, A.N. (eds) *The Middle Ear*. Springer New York, pp. 31-65.
- Ross, M.E. (2010) Gene-environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, **2**, 471-480.
- Rossi, M., Amaretti, A. & Raimondi, S. (2011) Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, **3**, 118-134.
- Roth, T.N., Hanebuth, D. & Probst, R. (2011) Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **268**, 1101-1107.
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kolhouse, J.F., Kamen, B.A. & Anderson, R.G. (1990) The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol*, **110**, 637-649.
- Ryan, A.S., Astwood, J.D., Gautier, S., Kuratko, C.N., Nelson, E.B. & Salem, N., Jr. (2010) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopment in childhood: a review of human studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **82**, 305-314.
- Salojin, K.V., Cabrera, R.M., Sun, W., Chang, W.C., Lin, C., Duncan, L., Platt, K.A., Read, R., Vogel, P., Liu, Q., Finnell, R.H. & Oravec, T. (2011) A mouse model of hereditary folate malabsorption: deletion of the PCFT gene leads to systemic folate deficiency. *Blood*, **117**, 4895-4904.
- Sanchez-Alcazar, J.A., Schneider, E., Hernandez-Munoz, I., Ruiz-Cabello, J., Siles-Rivas, E., de la Torre, P., Bornstein, B., Brea, G., Arenas, J., Garesse, R., Solis-Herruzo, J.A., Knox, A.J. & Navas, P. (2003) Reactive oxygen species mediate the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells. *Biochem J*, **370**, 609-619.
- Sanchez-Calderon, H., Rodriguez-de la Rosa, L., Milo, M., Pichel, J.G., Holley, M. & Varela-Nieto, I. (2010) RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One*, **5**, e8699.
- Santini, R., Brewster, C. & Butterworth, C.E., Jr. (1964) The Distribution of Folic Acid Active Compounds in Individual Foods. *Am J Clin Nutr*, **14**, 205-210.
- Sataloff, J. & Sataloff, R.T. (2005) *Hearing loss*. Taylor & Francis, Boca Raton.

- Schmitz, G. & Ecker, J. (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*, **47**, 147-155.
- Schuknecht, H. (1993) *Anatomy*. Lea & Febiger Philadelphia
- Schuknecht, H.F. (1976) *Pathology of the ear*. Harvard University Press, Cambridge Mass. etc.
- Schuknecht, H.F., Watanuki, K., Takahashi, T., Belal, A.A., Jr., Kimura, R.S., Jones, D.D. & Ota, C.Y. (1974) Atrophy of the stria vascularis, a common cause for hearing loss. *Laryngoscope*, **84**, 1777-1821.
- Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N. & Gronert, K. (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, **192**, 1197-1204.
- Serhan, C.N., Gotlinger, K., Hong, S. & Arita, M. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **73**, 155-172.
- Serhan, C.N., Hamberg, M. & Samuelsson, B. (1984) Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5335-5339.
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G. & Moussignac, R.L. (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, **196**, 1025-1037.
- Seti, H., Leikin-Frenkel, A. & Werner, H. (2009) Effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on IGF-I receptor signalling in colorectal cancer cells. *Arch Physiol Biochem*, **115**, 127-136.
- Sha, S.H., Chen, F.Q. & Schacht, J. (2009) Activation of cell death pathways in the inner ear of the aging CBA/J mouse. *Hear Res*, **254**, 92-99.
- Shane, B. (2009) *Folate chemistry and metabolism* CRC Press, Boca Raton, FL
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J. & McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, **122**, 789-801.

- Simopoulos, A.P. (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, **233**, 674-688.
- Sinha, R.A., Khare, P., Rai, A., Maurya, S.K., Pathak, A., Mohan, V., Nagar, G.K., Mudiam, M.K., Godbole, M.M. & Bandyopadhyay, S. (2009) Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model. *Int J Dev Neurosci*, **27**, 377-383.
- Slepecky, N. (1996) Structure of the Mammalian Cochlea. In Dallos, P., Popper, A., Fay, R. (eds) *The Cochlea*. Springer New York, pp. 44-129.
- Sliwinska-Kowalska, M. & Davis, A. (2012) Noise-induced hearing loss. *Noise Health*, **14**, 274-280.
- Sluss, H.K., Barrett, T., Derijard, B. & Davis, R.J. (1994) Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol*, **14**, 8376-8384.
- Smithells, R.W., Sheppard, S. & Schorah, C.J. (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*, **51**, 944-950.
- Sohal, R.S. & Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, **273**, 59-63.
- Spicer, S.S. & Schulte, B.A. (1991) Differentiation of inner ear fibrocytes according to their ion transport related activity. *Hear Res*, **56**, 53-64.
- Spinler, J.K., Sontakke, A., Hollister, E.B., Venable, S.F., Oh, P.L., Balderas, M.A., Saulnier, D.M., Mistretta, T.A., Devaraj, S., Walter, J., Versalovic, J. & Highlander, S.K. (2014) From prediction to function using evolutionary genomics: human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions. *Genome Biol Evol*, **6**, 1772-1789.
- Stefanutti, C., Morozzi, C. & Di Giacomo, S. (2013a) Italian multicenter study on low-density lipoprotein apheresis Working Group 2009 survey. *Ther Apher Dial*, **17**, 169-178.
- Stefanutti, C., Morozzi, C., Di Giacomo, S. & Italian Multicenter Study on Low-Density Lipoprotein Apheresis Working, G. (2013b) Italian multicenter study on low-density lipoprotein apheresis Working Group 2009 survey. *Ther Apher Dial*, **17**, 169-178.
- Stokstad, E.L.R. (1943) SOME PROPERTIES OF A GROWTH FACTOR FOR LACTOBACILLUS CASEI. *Journal of Biological Chemistry*, **149**, 573-574.

- Stover, P.J. (2004) Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev*, **62**, S3-12; discussion S13.
- Strain, G.M. (1996) Aetiology, prevalence and diagnosis of deafness in dogs and cats. *Br Vet J*, **152**, 17-36.
- Strain, G.M. (1999) Congenital deafness and its recognition. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **29**, 895-907, vi.
- Sullivan-Gunn, M.J. & Lewandowski, P.A. (2013) Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. *BMC Geriatr*, **13**, 104.
- Tabuchi, K., Nishimura, B., Nakamagoe, M., Hayashi, K., Nakayama, M. & Hara, A. (2011) Ototoxicity: mechanisms of cochlear impairment and its prevention. *Curr Med Chem*, **18**, 4866-4871.
- Talavage, T.M., Sereno, M.I., Melcher, J.R., Ledden, P.J., Rosen, B.R. & Dale, A.M. (2004) Tonotopic organization in human auditory cortex revealed by progressions of frequency sensitivity. *J Neurophysiol*, **91**, 1282-1296.
- Tamura, T., Freeberg, L.E. & Cornwell, P.E. (1990) Inhibition of EDTA of growth of *Lactobacillus casei* in the folate microbiological assay and its reversal by added manganese or iron. *Clin Chem*, **36**, 1993.
- Tamura, T. & Picciano, M.F. (2006) Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*, **83**, 993-1016.
- Tay, T., Wang, J.J., Kifley, A., Lindley, R., Newall, P. & Mitchell, P. (2006) Sensory and cognitive association in older persons: findings from an older Australian population. *Gerontology*, **52**, 386-394.
- Teng, Y.W., Mehedint, M.G., Garrow, T.A. & Zeisel, S.H. (2011) Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J Biol Chem*, **286**, 36258-36267.
- Thomson, D.L. (1947) The folic acid story. *Can Med Assoc J*, **56**, 432-435.
- Tilley, S.L., Coffman, T.M. & Koller, B.H. (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*, **108**, 15-23.

- Tourlouki, E., Polychronopoulos, E., Zeimbekis, A., Tsakountakis, N., Bountziouka, V., Lioliou, E., Papavenetiou, E., Polystipioti, A., Metallinos, G., Tyrovolas, S., Gotsis, E., Matalas, A.L., Lionis, C. & Panagiotakos, D.B. (2010) The 'secrets' of the long lived in Mediterranean islands: the MEDIS study. *Eur J Public Health*, **20**, 659-664.
- Treuting, P.M. & Dintzis, S.M. (2012) 22 - Special Senses: Ear. In Dintzis, P.M.T.M. (ed) *Comparative Anatomy and Histology*. Academic Press, San Diego, pp. 419-432.
- Uchida, Y., Sugiura, S., Ando, F., Nakashima, T. & Shimokata, H. (2011) Hearing impairment risk and interaction of folate metabolism related gene polymorphisms in an aging study. *BMC Med Genet*, **12**, 35.
- Ueland, P.M. (2011) Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis*, **34**, 3-15.
- Ueland, P.M. & Refsum, H. (1989) Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med*, **114**, 473-501.
- Vance, D.E. & Vance, J.E. (2002) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes [*New comprehensive biochemistry*, Elsevier, Amsterdam.
- Vardatsikos, G., Sahu, A. & Srivastava, A.K. (2009) The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation, and clinical implications. *Antioxid Redox Signal*, **11**, 1165-1190.
- Varela-Moreiras, G. & Alonso-Aperte, E. (1999) *Ácido fólico y salud*. Fundación Española de Nutrición. .
- Varming, K., Schmidt, E.B., Svaneborg, N., Moller, J.M., Lervang, H.H., Grunnet, N., Jersild, C. & Dyerberg, J. (1995) The effect of n-3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence. *Scand J Clin Lab Invest*, **55**, 47-52.
- Vatassery, G.T. & Maletta, G.J. (1983) Relationship between nutrition and dementia in the elderly. *Psychiatr Med*, **1**, 429-443.
- Vlajkovic, S.M., Guo, C.X., Dharmawardana, N., Wong, A.C., Boison, D., Housley, G.D. & Thorne, P.R. (2010) Role of adenosine kinase in cochlear development and response to noise. *J Neurosci res*, **88**, 2598-2609.
- Vlajkovic, S.M., Guo, C.X., Telang, R., Wong, A.C., Paramanathasivam, V., Boison, D., Housley, G.D. & Thorne, P.R. (2011) Adenosine kinase inhibition in the cochlea delays the onset of age-related hearing loss. *Exp Gerontol*, **46**, 905-914.

- Vlajkovic, S.M., Lin, S.C., Wong, A.C., Wackrow, B. & Thorne, P.R. (2013) Noise-induced changes in expression levels of NADPH oxidases in the cochlea. *Hear Res*, **304**, 145-152.
- Vodovotz, Y., Letterio, J.J., Geiser, A.G., Chesler, L., Roberts, A.B. & Sparrow, J. (1996) Control of nitric oxide production by endogenous TGF-beta1 and systemic nitric oxide in retinal pigment epithelial cells and peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*, **60**, 261-270.
- Vogel, C. & Marcotte, E.M. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, **13**, 227-232.
- Wang, J., Van De Water, T.R., Bonny, C., de Ribaupierre, F., Puel, J.L. & Zine, A. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J Neurosci*, **23**, 8596-8607.
- Wangemann, P. (2006) Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol*, **576**, 11-21.
- Watkins, D., Whitehead, V. & Rosenblatt, D. (2009) Megaloblastic anemia. In SH Orkin, S., Ginsburg, D., Nathan, D. (eds) *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. . Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 467–520.
- White, M.D., Papamandjaris, A.A. & Jones, P.J. (1999) Enhanced postprandial energy expenditure with medium-chain fatty acid feeding is attenuated after 14 d in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, **69**, 883-889.
- Whitehead, V.M. & Cooper, B.A. (1967) Absorption of unaltered folic acid from the gastro-intestinal tract in man. *Br J Haematol*, **13**, 679-686.
- WHO (1994) Fats and oils in human nutrition. Report of a joint expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. *FAO Food Nutr Pap*, **57**, i-xix, 1-147.
- Wicovsky, A., Muller, N., Daryab, N., Marienfeld, R., Kneitz, C., Kavuri, S., Leverkus, M., Baumann, B. & Wajant, H. (2007) Sustained JNK activation in response to tumor necrosis factor is mediated by caspases in a cell type-specific manner. *J Biol Chem*, **282**, 2174-2183.
- Willott, J.F., Aitkin, L.M. & McFadden, S.L. (1993) Plasticity of auditory cortex associated with sensorineural hearing loss in adult C57BL/6J mice. *J Comp Neurol*, **329**, 402-411.
- Wilson, S.D. & Horne, D.W. (1982) Use of glycerol-cryoprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid. *Clin Chem*, **28**, 1198-1200.

- Wills, L. (1931) Treatment of "Pernicious Anaemia of Pregnancy" and "Tropical Anaemia". *Br Med J*, **1**, 1059-1064.
- Winkels, R.M., Brouwer, I.A., Siebelink, E., Katan, M.B. & Verhoef, P. (2007) Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr*, **85**, 465-473.
- Yamada, K., Kawata, T., Wada, M., Isshiki, T., Onoda, J., Kawanishi, T., Kunou, A., Tadokoro, T., Tobimatsu, T., Maekawa, A. & Toraya, T. (2000) Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr*, **130**, 1894-1900.
- Ye, D., Zhang, D., Oltman, C., Dellsperger, K., Lee, H.C. & VanRollins, M. (2002) Cytochrome p-450 epoxygenase metabolites of docosahexaenoate potently dilate coronary arterioles by activating large-conductance calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*, **303**, 768-776.
- Ye, S.M. & Johnson, R.W. (2001) An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation*, **9**, 183-192.
- Yuasa, H., Inoue, K. & Hayashi, Y. (2009) Molecular and functional characteristics of proton-coupled folate transporter. *J Pharm Sci*, **98**, 1608-1616.
- Yusufi, A.N., Cheng, J., Thompson, M.A., Walker, H.J., Gray, C.E., Warner, G.M. & Grande, J.P. (2003) Differential effects of low-dose docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on the regulation of mitogenic signaling pathways in mesangial cells. *J Lab Clin Med*, **141**, 318-329.
- Zainal, Z., Longman, A.J., Hurst, S., Duggan, K., Caterson, B., Hughes, C.E. & Harwood, J.L. (2009) Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **17**, 896-905.
- Zdebik, A.A., Wangemann, P. & Jentsch, T.J. (2009) Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda)*, **24**, 307-316.
- Zeisel, S.H. (2009) Importance of methyl donors during reproduction. *Am J Clin Nutr*, **89**, 673S-677S.

- Zhao, Y., Calon, F., Julien, C., Winkler, J.W., Petasis, N.A., Lukiw, W.J. & Bazan, N.G. (2011) Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPARgamma-mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One*, **6**, e15816.
- Zheng, Q.Y., Johnson, K.R. & Erway, L.C. (1999) Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res*, **130**, 94-107.
- Ziller, S. (1996) *Grasas y aceites alimentarios*. Acribia, Zaragoza.

ANEXO 1



ANEXO 1

Composición nutricional del producto Eupoly®-3 EPA

<i>Valor Energético:</i> 900 Kcal/100g
<i>Proteínas:</i> 0%
<i>Glúcidos:</i> 0%
<i>Lípidos:</i> 99% <i>L. Saturados:</i> 30% aprox. <i>L. monoinsaturados:</i> 30% aprox. <ul style="list-style-type: none"> • Omega-9: 10% aprox. • Otros: 20 % aprox. <i>L. poliinsaturados:</i> mín. 40% <ul style="list-style-type: none"> • Omega-6: máx. 5%. • Otros: 35 % aprox.
<i>Fibra:</i> 0%
<i>Vitamina E:</i> mín. 150mg/kg

➤ **Paraformaldehído 4%** (1 litro): calentar 750 ml de agua destilada a 65° C, en agitación. Añadir 40g de paraformaldehído en polvo y dejar disolver completamente, hasta que la solución sea transparente (añadir 3-4 gotas de NaOH 1M para ayudar a la disolución). Dejar enfriar, filtrar y añadir 100 ml de PBS 10x. Ajustar volumen final a 1l con agua destilada.

➤ **EDTA 10% 0.3 M** (100 ml): pesar 10 gramos de EDTA, añadir 80 ml de H₂O milliQ y 1 gramo de NaOH puro y dejar en agitación hasta que la solución sea transparente. Ajustar el pH a 6.5 con NaOH 1M y ajustar el volumen hasta 100 ml con H₂O milliQ.

➤ **PBS 10x**

	1 Litro
Cloruro sódico (NaCl)	80 g
Cloruro de potasio (KCl)	2 g
Fosfato sódico, dibásico (Na₂HPO₄)	14.4 g
Fosfato potásico, monobásico (KH₂PO₄)	2.4 g
H₂O milliQ	Hasta 1 litro

Ajustar el pH a 7.4 con Cl.

➤ **RIPA**

	100 ml
Trisect 1M pH 7.4	5 ml
NaCl 5 M	30 ml
Triton-X-100 al 20%	5 ml
Sodio deoxicolato 10%	5 ml
SDS al 20%	0.5 ml
H₂O milliQ	50 ml

- **Laemmli** (tampón de lisis de proteínas): Tris 62,5 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, DTT 50 mM, azul de bromofenol 0.005%
- **Buffer de electroforesis (*Western blotting*)**: 100 ml Tris-Gly 10x +10 ml SDS 10% + 890 ml de H₂O milliQ.
- **Buffer de transferencia (*Western blotting*)**: 100 ml de Tris-Gly 10x, 200 ml de MeOH (Merck), 700 ml de H₂O milliQ.