

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

### **Grado en Biotecnología**

# **ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS POLIFENOLES DEL CACAO PARA PREVENIR LA PRESBICUSIA: ESTUDIO IN VITRO**

**Autor/es: Íñigo Guinea Ordax**

**Título del trabajo: ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS POLIFENOLES DEL CACAO PARA PREVENIR LA PRESBIACUSIO: ESTUDIO IN VITRO.**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe, en el grupo de Otorrinolaringología de la Universidad Europea de Madrid (ORL), con la Dra. Carolina Sánchez Rodríguez como tutora.

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMEN.....   | 4         |
| ABSTRACT.....  | 5         |
| <b>1. Introducción.....</b>  | <b>6</b>  |
| 1.1 Presbiacusia.....  | 6         |
| 1.2 Anatomía del oído interno y morfología celular del órgano de Corti.....                                      | 7         |
| 1.3 Estrés oxidativo.....  | 10        |
| 1.4 Tratamiento: Polifenoles.....  | 11        |
| 1.5 Líneas Celulares del modelo in-vitro.....  | 14        |
| <b>2 Objetivos.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>3 Material y métodos.....</b>   | <b>15</b> |
| 3.1 Cultivos celulares.....  | 15        |
| 3.2 Extracción de polifenoles a partir de polvos de cacao.....   | 16        |
| 3.3 Cuantificación polifenoles totales.....  | 16        |
| 3.4 Diseño experimental y tratamientos.....  | 17        |
| 3.5 Ensayo viabilidad celular.....   | 18        |
| 3.6 Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS).....   | 18        |
| 3.7 Ensayo de actividad mitocondrial.....  | 19        |
| 3.8 Ensayos de inmunofluorescencia.....  | 20        |
| 3.9 Análisis estadístico.....  | 20        |
| <b>4 Resultados.....</b>   | <b>21</b> |
| 4.1 El extracto de polifenoles del cacao presenta una alta concentración de compuestos fenólicos.....            | 21        |
| 4.2 El cacao aumenta la viabilidad y disminuye los cambios morfológicos de las células envejecidas HEI-OC1.....  | 22        |
| 4.3 El tratamiento con cacao disminuye la producción de ROS en las células senescentes.....                      | 24        |
| 4.4 Los polifenoles del cacao disminuyen la producción de ROS mitocondrial y la masa mitocondrial.....           | 26        |
| 4.5 Disminución de los marcadores de daño celular en las células senescentes previamente tratadas con cacao..... | 28        |
| <b>5. Discusión.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>6. Conclusión.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>7. Bibliografía.....</b>  | <b>41</b> |

## RESUMEN.

**Introducción:** El estrés oxidativo es uno de los principales factores que provoca que las células del oído interno entren en senescencia, lo que deriva en la aparición de la presbiacusia o pérdida de audición relacionada con la edad. Compuestos como los polifenoles extraídos del cacao tienen gran poder antioxidante y pueden ser un buen tratamiento preventivo contra la aparición del estrés y por lo tanto de la en presbiacusia.

**Objetivos:** estudiar el efecto preventivo de los polifenoles del cacao sobre la presbiacusia a través de la supresión del estrés oxidativo en las células auditivas.

**Material y métodos:** Se indujo senescencia celular células *House Ear Institute-Organ of Corti 1* (HEI-OC1) mediante  $H_2O_2$ , previamente tratadas con distintas concentraciones de polifenoles extraídos del cacao. Se realizaron experimentos de viabilidad celular, morfología, actividad mitocondrial, detección de aniones superóxido y detección de marcadores de estrés oxidativo y daño celular.

**Resultados:** Se comprobó que los polifenoles evitaban el daño celular ya que la viabilidad y la morfología no se vieron afectadas en células expuestas a estrés oxidativo tratadas previamente con polifenoles. También se comprobó que los polifenoles disminuían la producción de ROS, y de marcadores de daño celular producido por estrés oxidativo.

**Conclusión:** el tratamiento a concentraciones adecuadas del extracto de polifenoles del cacao puede ser preventivo para la presbiacusia provocada por la senescencia celular ya que podemos ver que los polifenoles disminuyen la producción de ROS.

## **ABSTRACT.**

**Introduction:** Oxidative stress is one of the main factors which causes the cells of the inner ear to enter into senescence, leading to the onset of presbycusis or age-related hearing loss. Compounds such as polyphenols extracted from cocoa have great antioxidant power and can be a good preventive treatment against the onset of stress and therefore presbycusis.

**Objectives:** to study the preventive effect of cocoa polyphenols on presbycusis by suppressing oxidative stress in auditory cells.

**Material and methods:** Cell senescence were induced in House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) cells by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, previously treated with different concentrations of polyphenols extracted from cocoa. Experiments were performed on cell viability, morphology, mitochondrial activity, superoxide anion detection and detection of markers of oxidative stress and cell damage.

**Results:** Polyphenols were shown to prevent cell damage as cell viability and morphology were not affected in cells exposed to oxidative stress and pre-treated with polyphenols. Polyphenols were also found to decrease the production of ROS, and markers of cell damage caused by oxidative stress.

**Conclusion:** treatment with appropriate concentrations of cocoa polyphenol extract may be preventive for presbycusis caused by cellular senescence as we can see that polyphenols decrease the production of ROS.

# 1. Introducción.

## 1.1 Presbiacusia.

Presbiacusia o pérdida de audición asociada a la edad (*ARHL, del inglés Age-related Hearing Loss*) es el termino general que se la da a todas las afecciones que provocan la pérdida de audición relacionada con la edad. Este trastorno se caracteriza por la reducción de la capacidad de escuchar sonidos, de la comprensión de estos en entornos ruidosos, una ralentización del procesamiento central de la información acústica y un deterioro de la localización de las fuentes sonoras. (Gates & Mills, 2005)

La ARHL se observa simultáneamente en ambos oídos en el espectro de altas frecuencias y es un proceso multifactorial que implica complejas interacciones entre factores intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (ambientales)(del Mar Rivas-Chacón et al., 2021)

La presbiacusia puede clasificarse en varios tipos dependiendo las células que estén dañadas:

- Presbiacusia sensorial: Se produce por la degradación de las células sensoriales de la cóclea, como las células ciliadas externas. Esto hace que el epitelio neurosensorial cambie y tome el aspecto de un epitelio indiferenciado.
- Presbiacusia neuronal: En este caso ocurre un cambio en el ganglio espiral y fibras nerviosas de la lámina espiral ósea.
- Presbiacusia estrial: Se da desde la tercera década de vida en adelante y aumenta lentamente. Esta presbiacusia se da por disfunción de la degeneración de la estría vascular.
- Presbiacusia conductiva coclear: Es causada por cambios anatómicos que pueden ser rigidez en la membrana basilar y alteraciones en el ligamento espiral por pérdida de fibrocitos IV.
- Presbiacusia central: en este caso están afectadas las conexiones neuronales encargadas de enviar el estímulo auditivo hasta la corteza cerebral. (Sanchez-Calderon et al., 2010; Varela-Nieto & Rivera, 2010)

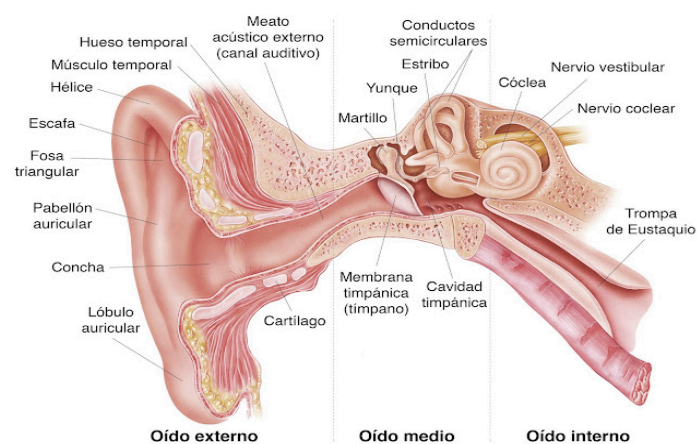
La ARHL aparte de afectar al oído también afecta a la situación psicosocial de la persona ya que se ha demostrado que la ARHL se asocia de forma independiente con un mayor

riesgo de caídas, depresión, soledad, demencia y deterioro cognitivo lo que provoca aislamiento social, depresión y pérdida de autoestima.(Gates & Mills, 2005; Paul & Brookes, 2015)

Además, la presbiacusia produce un gran gasto económico ya que se calcula que los costes médicos directos y de pérdida de productividad combinados atribuidos a la pérdida de audición en adultos de  $\geq 65$  años en Estados Unidos fueron de  $\sim 9.500$  millones de dólares. Teniendo en cuenta el aumento previsto de la esperanza de vida, se calcula que el coste anual aumentará hasta  $\sim 60.000$  millones de dólares en 2030 (Bowl & Dawson, 2019) ya que es una afección que sufre el 10% de la población menor de 65 años, y esta tasa aumenta hasta el 40% en la población mayor de 65 años (Gates & Mills, 2005) .

## 1.2 Anatomía del oído interno y morfología celular del órgano de Corti.

El oído de los mamíferos es un órgano muy complejo dividido en tres zonas que se pueden definir como oído externo, medio e interno (Figura 1). El oído se encarga de la percepción de sonidos (región auditiva), como de la estabilización de la cabeza, ojos, tronco y el equilibrio (región vestibular).

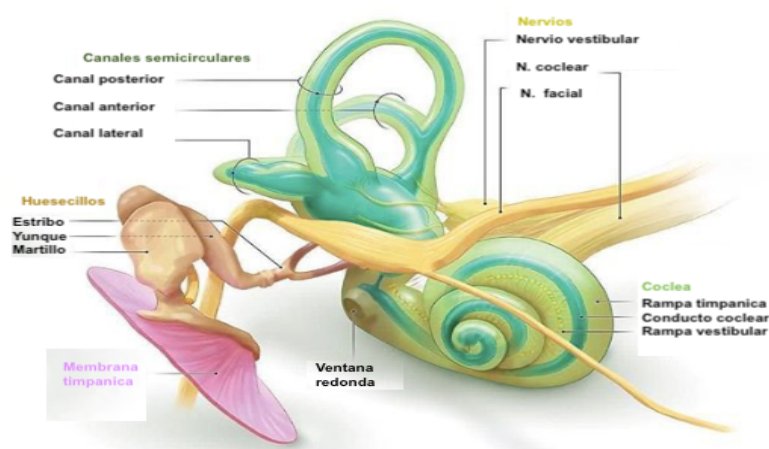


**Figura 1.** Anatomía del oído en mamíferos. <https://www.audioprotesishoy.com/2020/04/anatomia-del-oido.html>

El oído externo está compuesto por el pabellón auricular y el canal auditivo encargados de canalizar el sonido desde el exterior hasta la membrana timpánica, el cual se extiende desde la cara externa de la cabeza hasta la membrana timpánica. (Ekdale, 2016)

El oído medio es una cámara llena de aire situada entre el oído externo y el oído interno llamada cavidad timpánica, que está separada del oído externo por la membrana timpánica y del oído interno por las ventanas vestibular y coclear. La cavidad timpánica está rodeada por la bulla timpánica del hueso temporal y de ella sale la trompa de Eustaquio hacia la nasofaringe que se encarga de igualar la presión en ambos lados del tímpano. También encontramos tres huesecillos encargados de transmitir la vibración que genera el sonido en el tímpano hacia el oído interno. (Heine, 2004)

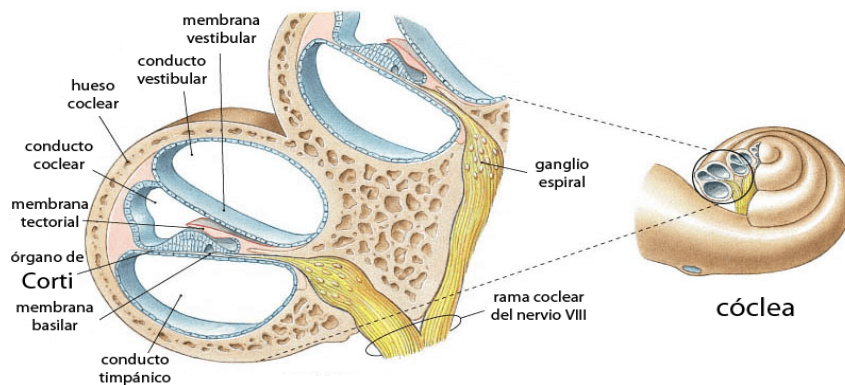
El oído interno se encuentra dentro del laberinto óseo que está ubicado dentro del hueso temporal petroso. El laberinto óseo consta de dos partes: la cóclea, que se ocupa de la audición, y los canales semicirculares, que se ocupan del equilibrio. La cóclea y los canales semicirculares comparten una entrada común, el vestíbulo, que se comunica con la cavidad timpánica a través de la ventana vestibular. La cóclea y los canales semicirculares tienen una porción ósea que rodea una porción membranosa (Figura 2). Las porciones óseas se denominan canales y las porciones membranosas, conductos. Estas zonas están llenas de líquido llamado perilinfa (en la porción ósea) y endolinfa (en la porción membranosa) estos líquidos tienen diferente composición iónica por lo que nunca están en contacto ya que no hay conexión entre las porciones ósea y membranosa. (Ekdale, 2016; Heine, 2004)



**Figura 2: Anatomía del oído medio e interno:** Membrana timpánica, cadena de huesecillos, canales semicirculares, nervios y partes de la cóclea. <https://www.pinterest.com.mx/pin/126523070769536982/>



La cóclea está dividida en su interior por tres compartimentos, que son la rama timpánica, la rama vestibular y el conducto coclear. entre esos compartimentos se encuentra una membrana llamada membrana basilar donde se asienta el órgano de Corti, (Figura 3) la función de esta membrana es transmitir las vibraciones que llegan desde el estribo y que viajan por la endolinfa y la perilinfa.

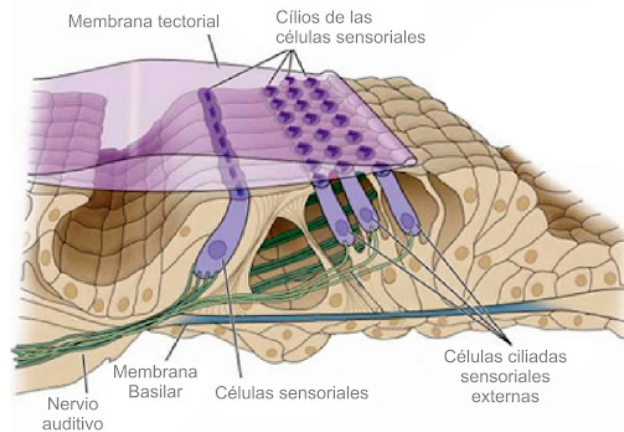


**Figura 3.** Anatomía interna de la cóclea. <https://curiosoando.com/que-son-las-celulas-pilosas-del-oido>

Dentro del órgano de Corti nos encontramos con células ciliadas internas y externas que difieren en cuanto a su morfología y posición, pero también tienen diferencias funcionales. Entre las células ciliadas externas e internas hay una serie de células de soporte que incluyen células pilares internas y externas. Las células pilares forman las paredes del túnel de Corti.

Las células ciliadas externas e internas están inervadas por ramas del nervio craneal VIII. El ganglio espiral inerva el órgano de Corti a través de las paredes del modiolo que son cribiformes y forman un suelo óseo en forma de tamiz por el que pasan numerosos nervios diminutos procedentes del ganglio del nervio auditivo espiral. (Figura 4).

El desplazamiento de la membrana basilar con respecto a la membrana tectorial conduce a la traducción de una fuerza mecánica a una señal eléctrica a través de la desviación de los estereocilios de las células ciliadas, y esta señal eléctrica que viaja por el nervio auditivo espiral es la encargada de que interpretemos los sonidos. (Ekdale, 2016)



**Figura 4.** Órgano de Corti. <http://www.soniton.es/?oido-interno.html>.

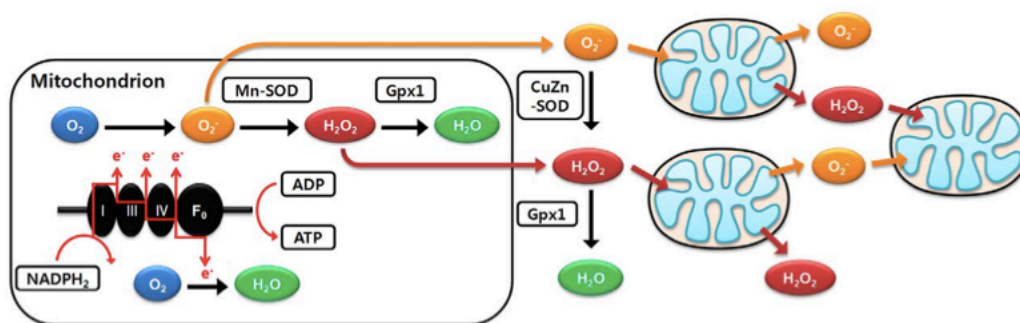
### 1.3 Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo provoca el desarrollo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares, del páncreas y riñones, cataratas, diabetes, artrosis, entre otras, además de que está implicado en la mutagénesis, la carcinogénesis, glaucoma, la peroxidación de los lípidos, las alteraciones de la función correcta de las membranas y la oxidación y fragmentación de las proteínas. (del Mar Rivas-Chacón et al., 2021; Lamuela-Raventós et al., 2005; Tanabe et al., 2012).

Según la teoría del envejecimiento, los organismos al envejecer sufren una acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species), aumentando el estrés oxidativo y disminuyendo los sistemas antioxidantes del organismo, produciéndose un desequilibrio (da Costa et al., 2016). Todo esto se debe a la actividad de las mitocondrias que son las encargadas de la producción de energía, pero además producen ROS que se acumulan como subproducto de la cadena transportadora de electrones causando daños mitocondriales. Los ROS, cuando están presentes en niveles controlados, por debajo de cierto umbral, funcionan como segundos mensajeros y estimulan la proliferación celular (Torrens-Mas, 2017), en cambio, niveles elevados de ROS pueden causar una rápida despolarización del potencial de membrana interna mitocondrial, y por lo tanto el deterioro de la fosforilación oxidativa. Las mitocondrias dañadas producen ROS en forma de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales aceleran más la producción de ROS. (Figura 5). (Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018; J. Park et al., 2011). Toda esta acumulación de ROS provoca que la mitocondria abra el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que hace que

esta se hinche y rompa su membrana y libere señales proapoptóticas, Además de que aumenta la expresión de genes de senescencia, la disminución de genes de supervivencia celular, ruptura del ADN, etc. (Facchin et al., 2018a; Giorgio et al., 2018). Normalmente el cuerpo humano tiene un sistema antioxidante para eliminar estos radicales, manteniendo así un equilibrio entre oxidación y antioxidación. Pero cuando el cuerpo no es capaz de eliminar el exceso de ROS mediante las enzimas antioxidante intracelular y sustancias extracelulares se dará un estrés oxidativo que provoca la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas, en nuestro caso la presbiacusia. (Ji et al., 2020a).

Además de otros factores que provocan el envejecimiento de las células del oído interno como el acortamiento de los telómeros, la senescencia prematura inducida por el estrés (*SIPS*, del inglés *Stress-Induced Premature Senescence*), causada por un oncogén o agentes quimioterapéuticos, el estrés oxidativo es uno de los principales factores de envejecimiento celular que desencadena en la aparición de presbiacusia. (del Mar Rivas-Chacón et al., 2021)



**Figura 5. Formación de ROS en la mitocondria:** Formación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) debido al transporte de electrones como subproducto de la formación de ATP. (J. Park et al., 2011)

#### 1.4 Tratamiento: Polifenoles.

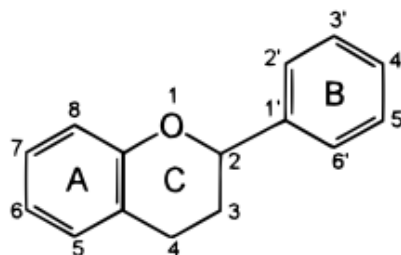
Las medidas terapéuticas actuales para la presbiacusia van encaminadas a mejorar la comunicación de las personas que la padecen, y para ello se puede actuar amplificando el sonido mediante prótesis auditivas y mejorando algunas condiciones ambientales. El avance en el desarrollo de dispositivos electrónicos, basados en el conocimiento de la anatomía y la fisiología de la audición, ha contribuido notablemente a paliar en parte la

pérdida de audición. Sin embargo, existen diferentes líneas de investigación y desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que incluyen: terapia génica, aplicación de células madre e intervención farmacológica. (Hussain et al., 2017)

La intervención farmacológica más común para tratar la presbiacusia es la aplicación de antioxidantes ya que se considera como un tratamiento preventivo o para reducir el daño inducido por el estrés oxidativo en las células del oído.

En los últimos veinte años el interés por los polifenoles ha aumentado considerablemente entre los investigadores. La razón principal de este interés es el reconocimiento de las propiedades antioxidantes de estos compuestos, su papel en la prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo, tales como cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares y otras, incluyendo obesidad y diabetes, o en procesos fisiológicos como el envejecimiento. Los polifenoles son compuestos presentes en las plantas ya que son metabolitos secundarios de estas, y representan un amplio grupo de al menos 10.000 compuestos diferentes que contienen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilos unidos a ellos (Figura 6).

En las plantas los polifenoles actúan contra distintos tipos de estrés, protegen contra especies reactivas del oxígeno, nitrógeno, luz ultravioleta o patógenos. (Brglez Mojzer et al., 2016)



**Figura 6.** Estructura química básica de los flavonoides. (Pandey & Rizvi, 2009)

La forma de actuar contra el estrés oxidativo de los polifenoles depende de su estructura química, de su combinación con otros compuestos, de su solubilidad y su absorción.

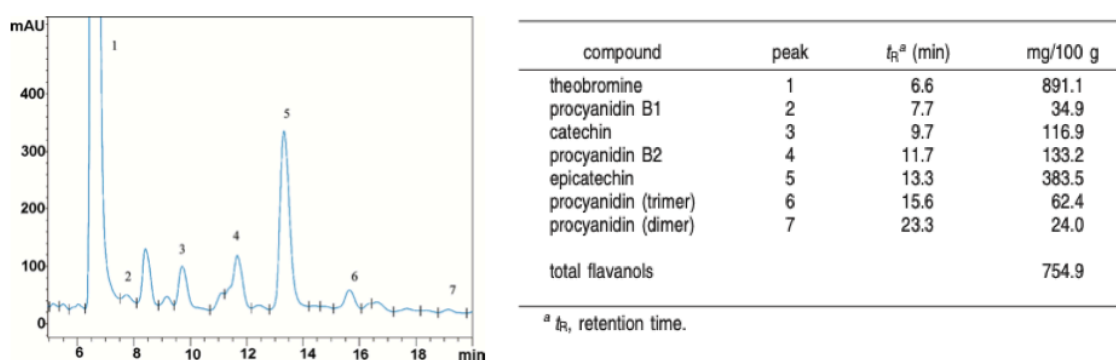
Estos compuestos actúan sobre la regulación enzimática, potenciando la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidase, catalasa, glutatión reductasa o glutatión tiotransferasa.

Los polifenoles también inhiben la producción de óxido nítrico sintasa ya que la sobreexpresión de óxido nítrico sintasa conduce a la producción de una gran cantidad de NO y una concentración excesivamente alta de NO conducirá a la producción de radicales libres OH y dióxido de nitrógeno en grandes cantidades, causando así daños en las proteínas, los ácidos nucleicos y las membranas celulares, acelerando el daño mitocondrial y promoviendo la apoptosis celular. Por lo que si se reduce la expresión de óxido nítrico sintasa se reducirá la producción de NO y por lo tanto aumentará significativamente la capacidad antioxidante. (Ji et al., 2020b)

Además de la regulación enzimática los polifenoles pueden tener un efecto sobre la respuesta antioxidante celular ya que actúan sobre *Keap1* (*del inglés Kelch Like ECH Associated Protein 1*), una proteína citosólica cuya función es regular la actividad del factor de transcripción Nrf2, un factor de transcripción clave del sistema de estrés antioxidante celular ya que se combina con el elemento de respuesta antioxidante (ARE) y activa las vías de señalización Nrf2-ARE esenciales en la respuesta a estrés antioxidante endógeno. (Halib et al., 2020; Ruskovska et al., 2020)

Los polifenoles, clasificados según su estructura química, incluyen los ácidos fenólicos, los flavonoides, los estilbenos, los lignanos y los taninos. Los flavonoides son el tipo de polifenol más abundante en los alimentos. El cacao procedente de la planta *teobroma cacao* endémica de la cuenca del Amazonas, hoy en día se cultiva en muchas regiones del trópico húmedo, es un producto agrícola económicamente importante para millones de personas en todo el mundo. Lo cultivan unos 6 millones de agricultores en todo el mundo, y los medios de vida de más de 40 millones de personas dependen del cacao, (Wickramasuriya & Dunwell, 2018) sus productos son alimentos de consumo habitual en todo el mundo, y una fuente de polifenoles que muestran un gran contenido fenólico (Figura 7) ya que entre el 12 – 18% del peso total de polvos de cacao son polifenoles y aproximadamente el 35% del contenido total de polifenoles en el cacao no fermentado, secado y tostado es la epicatequina. Los flavonoides del cacao consisten

principalmente en flavanoles (epicatequina, catequina y procianidinas) y un flavonol (quercetina)(Halib et al., 2020; Lamuela-Raventós et al., 2005) Ya que las semillas de cacao son una rica fuente de antioxidantes polifenólicos se ha comprobado que los productos a base de cacao aportan una mayor proporción de la ingesta dietética de antioxidantes fenólicos que el té verde, el vino, la soja y los arándanos, que son conocidos productos alimenticios y bebidas ricos en antioxidantes. (Bart-Plange & Baryeh, 2003)



**Figura 7.** HPLC del extracto de polifenoles del cacao: principales flavonoides que contiene el cacao y sus respectivas concentraciones (M. A. Martín et al., 2008).

### 1.5 Líneas Celulares del modelo in-vitro.

El House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) es una línea celular procedente del oído de ratones transgénicos immortomouse™. Es ampliamente utilizada en investigación tanto para la senescencia celular como para el cribado de fármacos ototóxicos, el estudio de vías apoptóticas, la autofagia, el mecanismo de protección celular, las respuestas inflamatorias, la diferenciación celular, los efectos de la hipoxia, el estrés oxidativo y la expresión de canales y receptores moleculares.(G. M. Kalinec et al., 2016; C. Park et al., 2016)

Las células HEI-OC1 son fáciles de cultivar ya que son muy resistentes y crecen adheridas a la superficie, pero, sin embargo, requieren algunas condiciones especiales, como usar medio sin antibióticos, así como la incubación a 33 °C y 10% CO<sub>2</sub> (G. M. Kalinec et al., 2016)

Estas células albergan un gen mutado que expresa el antígeno T grande del SV40 bajo el control de un elemento promotor inducible por el interferón. Para la expresión de este gen, las células HEI-OC1 se cultivan en condiciones permisivas, es decir a 33 °C Y 10% CO<sub>2</sub>, lo que da lugar a la desdiferenciación de las células y a una proliferación acelerada; si las células se cultivan en condiciones no permisivas, a 39°C Y 5% CO<sub>2</sub> dará lugar a la desnaturalización de la proteína codificada por el gen, lo que provoca una disminución de la proliferación, la diferenciación celular y en el caso de las HEI-OC1 la muerte celular. (G. Kalinec et al., 2016)

## 2 Objetivos.

El objetivo principal es el estudio del efecto preventivo de los polifenoles del cacao sobre la presbiacusia a través de la supresión del estrés oxidativo en las células auditivas.

1. Comprobar el efecto del cacao sobre la viabilidad celular.
2. Estudiar la capacidad antioxidante de los polifenoles.
3. Comprobar la actividad mitocondrial tras el tratamiento con polifenoles del cacao.

## 3 Material y métodos.

### 3.1 Cultivos celulares

En este estudio se utilizó la línea celular perteneciente al oído interno de ratón: *House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1)*. son células adherentes). Las células se cultivaron a 33°C, 10% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo utilizado fue *Dubelcco's Eagle's medium (DMEM Gibco BRL, Gaithersburg, MD)*, un medio rico en glucosa, preparado junto a un 10% de suero fetal bovino y libre de antibióticos.

Las células fueron cultivadas en Flasks de 75cm<sup>2</sup>, y se comprobaron a diario mediante microscopio óptico invertido (*Olympus CKX41*) el crecimiento y la confluencia de dichas células, para hacer los subcultivos (pases) necesarios, o congelar el cultivo a -80°C.

Para realizar los pases se utilizó tripsina EDTA de *BioWHittaker®* para levantar las células y FBS + 10% DMSO para congelarlas a -80°C.

### **3.2 Extracción de polifenoles a partir de polvos de cacao.**

Los polifenoles del cacao (de la marca *CHOCOCRU*<sup>®</sup>, se extrajeron siguiendo el protocolo descrito por María Ángeles Martín y col. (2010). (M. Á. Martín et al., 2010)

A partir de 1 g de cacao en polvo:

1. Se añadió 40 mL de solución acuosa de metanol (50 % v/v) con 0,8 % de HCl 2N (para 100 mL, añadir 800 µL de HCl 2N).
2. Después se agito durante 1 h a temperatura ambiente (TA) (con gradilla tumbada en agitador orbital).
3. Se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm.
4. Se separó el sobrenadante y el pellet se extrajeron de nuevo con 40 mL de acetona/agua (70:30 v/v), repitiendo el proceso de agitación 1 h a TA y centrifugando 10 min a 3000 rpm. Los sobrenadantes obtenidos se combinaron con los extraídos anteriormente.
5. Se evaporo la muestra en el rota vapor (BÜCHI Rotavapor R-114) 20-30 minutos (depende del volumen de muestra).
6. Cuando la muestra estuvo densa, se añadió 10mL de agua milliQ y durante 20 minutos dejar en el baño de ultrasonidos.
7. Posteriormente se recogió con una pipeta el extracto y se guardó en un falcon.
8. Se liofilizó el extracto de cacao.
9. El liofilizado se homogenizo.
10. Se preparó dilución stock.
11. Por último, se filtró con un filtro de 0,2 µm, para esterilizar.

### **3.3 Cuantificación polifenoles totales.**

Una vez que obtuvimos los extractos de polifenoles del cacao, analizamos la cantidad de polifenoles mediante el kit Folin Ciocalteau Phenolic Content Quantification<sup>™</sup> de BioQuoChem usando el protocolo proporcionado por el fabricante.

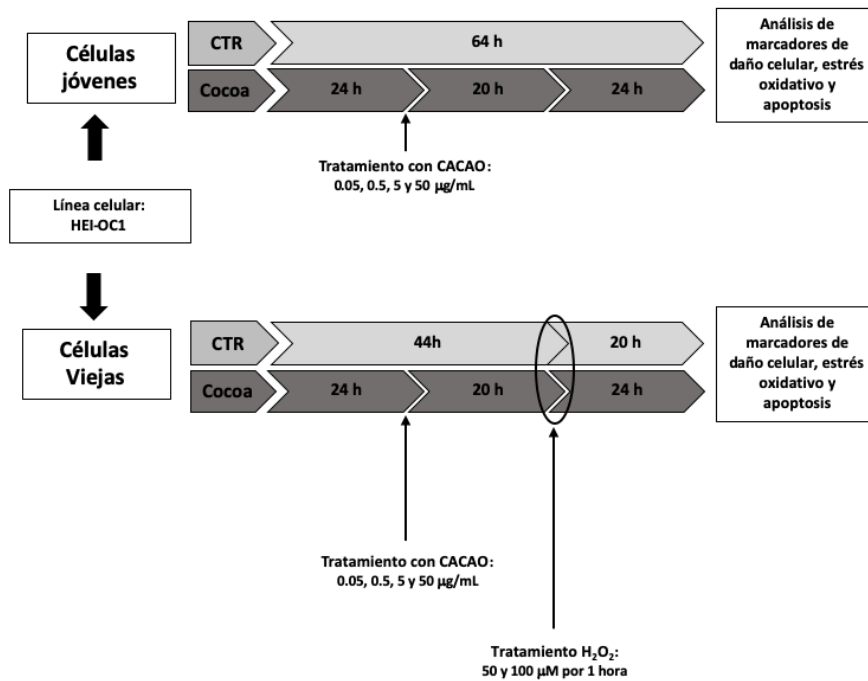


Este ensayo de cuantificación fenólica se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino desde los compuestos fenólicos para formar un cromóforo azul constituido por un complejo fosfotúngstico/fosfomolibdeno donde la absorción máxima depende de la concentración de compuestos fenólicos. El reactivo Folin-Ciocalteu reducido es detectable con un espectrofotómetro en el rango de 690 a 710 nm a una temperatura de 37°C. Para ello hicimos distintas diluciones del extracto de polifenoles para obtener una absorbancia de entre 0 y 1,8nm ya que entre esos rangos se encuentra el ácido gálico. Se utilizó el ácido gálico como compuesto estándar de referencia y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (mg/mL). Para un resultado óptimo cuantificamos por duplicado las diluciones estándar y las muestras del extracto de polifenoles. (*Folin Ciocalteu Phenolic Content Quantification Assay Kit*, n.d.)

### **3.4 Diseño experimental y tratamientos.**

Las líneas celulares HEI-OC1 se dividen en dos grupos, “células jóvenes” y “células viejas” Para inducir envejecimiento celular, las células se trataron con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 100mM durante 1 hora.

Tras 24h de crecimiento sin tratamiento se añadió el extracto de polifenoles del cacao en distintas concentraciones (0.05, 0.5, 5, 50mg/mL) exceptuando al grupo control y se incubaron durante 20h. Después al grupo de “células viejas” se les indujo el envejecimiento celular. Posteriormente se volvió a tratar a las células con el extracto de cacao y tras otras 24h se realizaron diferentes ensayos (Figura8).



**Figura 8.** Esquema del tratamiento de cacao sobre células HEI-OC1

### 3.5 Ensayo viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó mediante el reactivo PrestonBlue® (Thermo Fisher). El PrestonBlue® es un indicador de viabilidad celular que al entrar en contacto con las células vivas se reduce y pasa de un color violeta a uno rosáceo con gran fluorescencia. En placas de 96 pocillos se sembraron las células a una concentración de  $12 \times 10^4$  células/mL y tras 24h de incubación se trataron según el grupo experimental (ver fig. 8). Al finalizar el experimento, se añadió un 20ml de PrestonBlue® (ThermoFisher) por pocillo. Tras 2h de incubación se midió la fluorescencia con el lector de placas FLUOstar Omega (RFU: 560/590)

### 3.6 Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Para este ensayo se utilizó la sonda fluorescente dihidrotidio (DHE; Calbiochem, San Diego, CA USA). Este compuesto entra a la célula por difusión pasiva y tras su reacción con el anión superóxido la DHE forma un producto rojo fluorescente, el 2-hidroxi-etidio que se podrá observar bajo el microscopio de fluorescencia. Además, la DHE también puede sufrir una oxidación inespecífica por peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) o el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) por lo que también se detectaran estos compuestos. (Wojtala et al., 2014)

En placas de 8 pocillos (x-well, Sarstedt) se cultivaron las células a una concentración de  $12 \times 10^4$  células/mL y se añadieron los tratamientos anteriormente descritos (Figura 8). A continuación, las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído, y se permeabilizaron con PBS+ 0,3 % de tritón. Se añadió la sonda DHE y, por último, se montó con medio 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de Flormount-G® (SouthernBiotech). Posteriormente con el microscopio de fluorescencia Olympus BX51, y el programa ImageJ analizó los datos cuantitativos de fluorescencia.

Brevemente, el nivel de fluorescencia en una región determinada (por ejemplo, el núcleo o el citoplasma) se determinó con el programa ImageJ de la siguiente manera (1) se seleccionó la célula de interés utilizando las herramientas de dibujo/selección de forma libre; (2) se seleccionó el área, la densidad integrada y el valor medio de gris; (3) se seleccionó en el menú Analizar "establecer medidas"; (4) se seleccionó entonces "medir" en el menú analizar, lo que hizo que apareciera un cuadro emergente con los valores de esa primera célula; (5) a continuación, se seleccionó una región próxima a la célula que no tiene fluorescencia para que sirva de fondo; (6) se repitió este paso para las demás células del campo de visión de la medición; (7) se seleccionaron todos los datos de la ventana de resultados, y se copiaron y pegaron en una nueva hoja de cálculo de Excel; (8) por último, se utilizó la siguiente fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF)  $CTCF = \text{densidad integrada} - (\text{área de la célula seleccionada} * \text{fluorescencia media de las lecturas de fondo})$ .

### **3.7 Ensayo de actividad mitocondrial**

Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos Nucleon® Delta Surface (ThermoScientific), a una concentración de  $25 \times 10^4$  células/pocillo y se añadieron los tratamientos anteriormente descritos (Figura 8).

Después, se utilizaron los kits de tinción Mitochondrial Tracker Green Staining de abcam® y el Indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX™ Red de Invitrogen™.

Mitochondrial Tracker Green es una sonda selectiva mitocondrial que se une a las proteínas mitocondriales reaccionando con los residuos de cisteína y se acumula en la

matriz mitocondrial, dando a esta una fluorescencia de color verde que nos permite cuantificar la cantidad de mitocondrias activas en la célula. (Monteiro et al., 2020)

Por otro lado, el MitoSOX™ Red es permeable a las células vivas y se dirige rápida y selectivamente a las mitocondrias. Una vez en las mitocondrias, el reactivo MitoSOX™ Red es oxidado por el superóxido y muestra fluorescencia roja. (Kauffman et al., 2016) las imágenes fueron tomadas con el programa ImageJ.

### **3.8 Ensayos de inmunofluorescencia**

Para los ensayos de inmunofluorescencia se cultivaron las células a una concentración celular de  $10^5$  células/mL en placas de 8 pocillos (Lab-Tek® II Chamber Slide®) y tras 24 h de incubación se procedió con los tratamientos descritos anteriormente (Figura 8).

Una vez finalizado el experimento, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4%, se permeabilizaron con PBS+Tritón 0,3% y se bloquearon con PBS+5% BSA, para después incubar con los anticuerpos primarios Anti-FOXO1A antibody 1/100; Anti-8-Oxoguanine antibody 1/50 de (abcam®) y SIRT3 anticuerpo 1/50; SIRT1 anticuerpo 1/50; Caspasa-3 antibody 1/10 de (Santa Cruz biotechnology®) toda la noche a 4°C. Después, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes, AlexaFluor488 o 546 (Invitrogen) durante 1h a 37°C. Finalmente se tiñeron y montaron las placas con medio de montaje con DAPI, Flomount-G<sup>3</sup> (SouthernBiotech) y las muestras se observaron con el microscopio de fluorescencia Olympus BX51, y el programa ImageJ.

### **3.9 Análisis estadístico**

Los valores estadísticos se calcularon utilizando el software SPSS 19.0. Los datos se presentan como media  $\pm \sigma$  (Desviación estándar). El análisis estadístico fue realizado por la prueba de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron para indicar la importancia estadística.

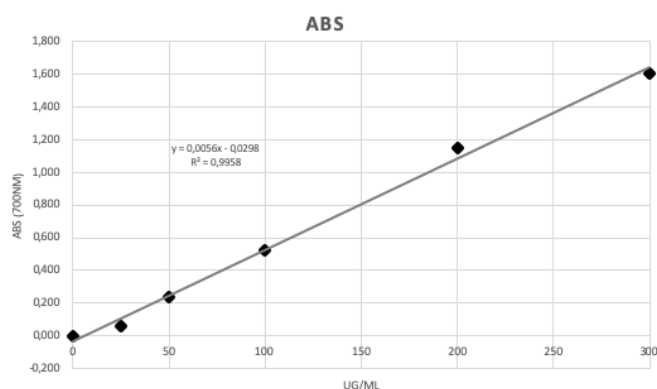
## 4 Resultados.

### 4.1 El extracto de polifenoles del cacao presenta una alta concentración de compuestos fenólicos.

La concentración de polifenoles se midió utilizando el ácido gálico como compuesto de referencia y por ello se realizó una recta de calibrado la cual nos relaciona la absorbancia con la concentración de polifenoles.

| Recta de calibrado |       |              |
|--------------------|-------|--------------|
|                    | ABS   | µg/ml ac gal |
| S1                 | 0,000 | 0            |
| S2                 | 0,062 | 25           |
| S3                 | 0,241 | 50           |
| S4                 | 0,527 | 100          |
| S5                 | 1,151 | 200          |
| S6                 | 1,607 | 300          |

**Figura 9:** Tabla de la absorbancia del ácido gálico y sus respectivas concentraciones



**Figura 10:** Recta de calibrado.

Para las distintas diluciones de polifenoles obtuvimos que a diluciones menores de 1/8 la concentración era muy elevada y la absorbancia era superior a 1,8nm por lo que los resultados obtenidos se calcularon a partir de las diluciones 1/8, 1/16 y 1/32, ya que estas diluciones se encuentran dentro de los rangos de absorbancia de la recta de calibrado, obtenido una concentración de polifenoles en el extracto de cacao de 1573,73µg/mL o lo que es lo mismo 1,57g/mL.

| Resultados    | abs (700nm) | µg/mL poli | Factor de dilu | Media µg/mL |
|---------------|-------------|------------|----------------|-------------|
| Dilución 1/1  | 3,15        | -          | -              | 1573,73     |
| Dilución 1/2  | 2,96        | -          | -              |             |
| Dilución 1/4  | 1,83        | -          | -              |             |
| Dilución 1/8  | 1,06        | 194,45     | 1555,60        |             |
| Dilución 1/16 | 0,52        | 98,45      | 1575,20        |             |
| Dilución 1/32 | 0,25        | 49,70      | 1590,40        |             |

**Figura 11:** Tabla de resultados de la absorbancia y concentración de polifenoles en el extracto de cacao

#### **4.2 El cacao aumenta la viabilidad y disminuyo los cambios morfológicos de las células envejecidas HEI-OC1.**

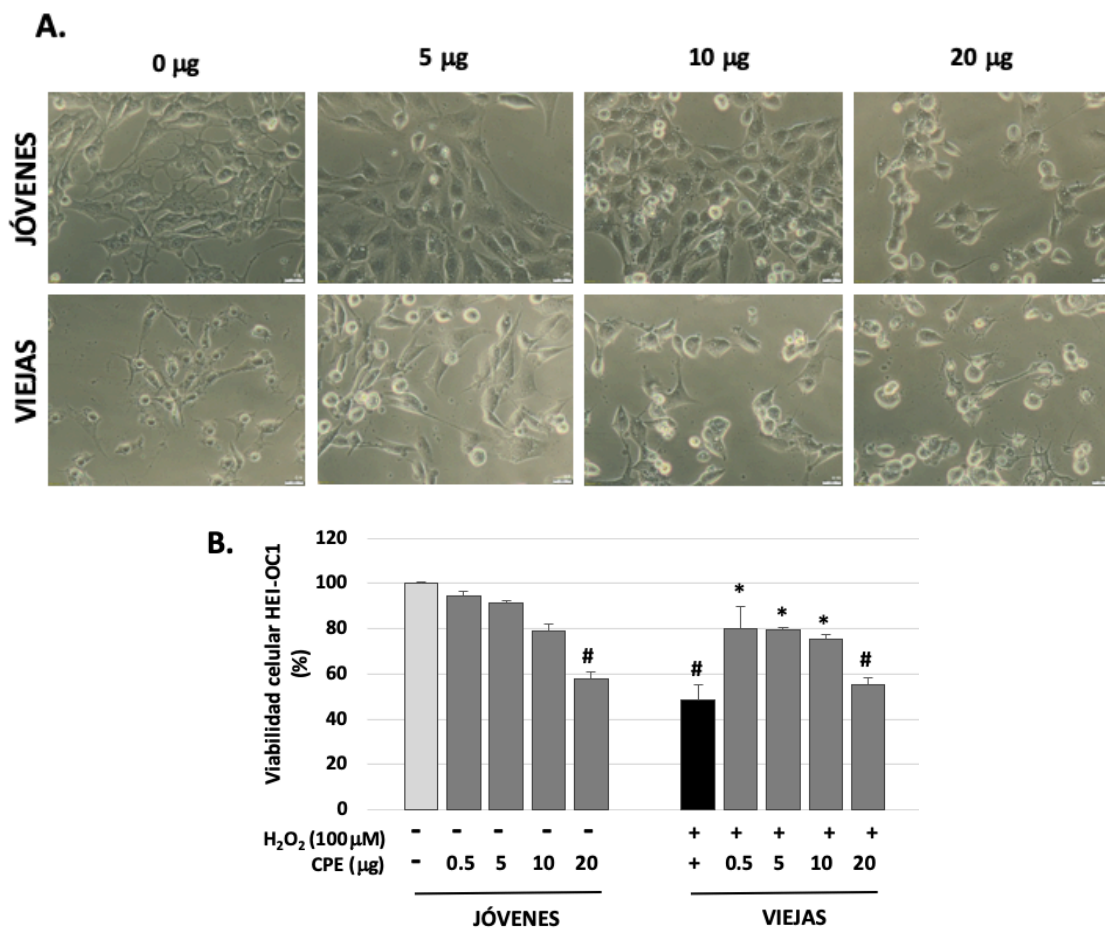
La viabilidad celular aumentó significativamente en las células viejas tratadas con el extracto de polifenoles a concentraciones de 0,5 y 5mg/mL respecto al grupo control viejas como podemos ver en la figura 12, ya que la viabilidad paso de un 49% a un 80%, lo que nos sugiere que el extracto de polifenoles a concentraciones bajas protege contra el estrés oxidativo que se produce en células del oído. Por otro lado, a concentraciones de cacao más elevadas la viabilidad aumenta en menor medida respecto al grupo control viejas, hasta llegar al punto en el que prácticamente no aumentó.

Por otro lado, se comprobó a que a altas concentraciones el extracto de polifenoles es tóxico, hasta alcanzar un valor de 58% a concentraciones de 20mg/mL; mientras que la viabilidad no se vio afectada en las células jóvenes que fueron tratadas con el extracto a concentraciones de 0.5 y 5mg/mL.

En los siguientes experimentos se excluyó la concentración de 0.5mg/mL ya que comprobamos que obtuvimos los mismos resultados que el tratamiento a concentraciones de 5mg/mL.

Las células sufrieron cambios morfológicos en distinta medida al ser sometidas al tratamiento con polifenoles, en el caso de las células jóvenes a concentraciones de 5µg/mL no sufrieron cambios con respecto al control, y a concentraciones de 10µg/mL sufrieron cambios mínimos. Por otro lado, a concentraciones de 20µg/mL los cambios morfológicos fueron algo más pronunciados, reduciendo su tamaño y número. Lo que nos corrobora que a concentraciones elevadas el tratamiento con cacao comienza a ser toxico para las células.

Por otro lado, en las células viejas se apreciaron cambios morfológicos positivos respecto al control viejo, ya que en este control las células sufrieron cambios morfológicos significativos como reducción del citoplasma, estrechamiento y menor número de células, en cambio, en las células viejas tratadas con 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  los cambios morfológicos se redujeron considerablemente, y en el caso de las células tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se apreció una pequeña disminución en los cambios morfológicos, pero no lo suficiente, asemejándose a las células jóvenes tratadas con esa misma concentración, lo que nos dice que la concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resulta tóxica para las células y a concentraciones bajas previene contra el estrés oxidativo inducido por el insulto de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



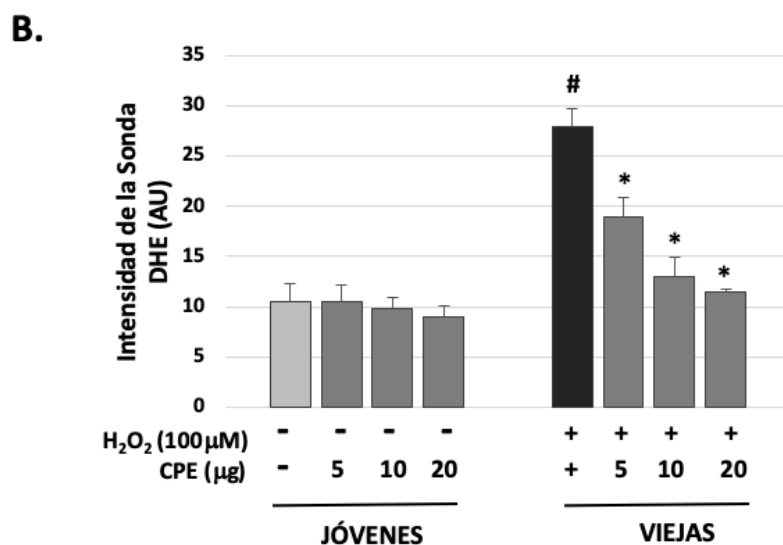
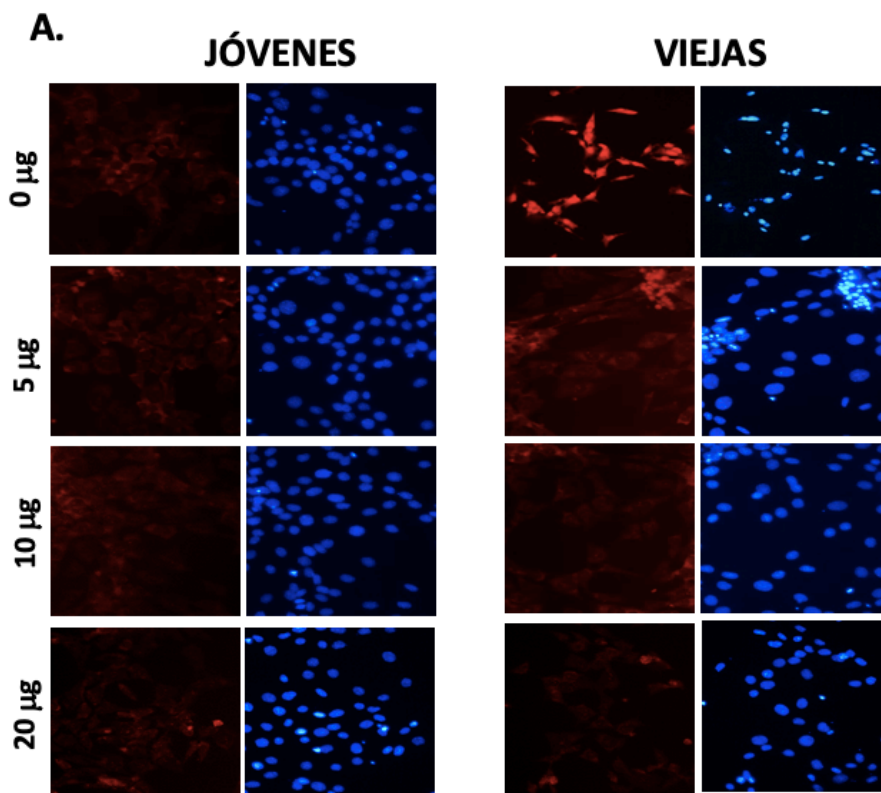
**Figura 12.** El cacao aumenta la viabilidad de las células auditivas viejas. A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos de las células auditivas HEI-OC1 después de los tratamientos. Las células se analizaron bajo un microscopio de luz (con un aumento de 20 $\times$ ) y las imágenes de las células se detectaron bajo iluminación de campo brillante con el microscopio Olympus CKX41 y el sistema de imágenes acoplado cellSens Entry. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ . B) Viabilidad celular medida mediante el ensayo PrestoBlue de

las células auditivas tras los tratamientos en células HEI-OC1. Todos los valores son medias  $\pm\sigma$  (n = 4), y los resultados del análisis de varianza (ANOVA). \*p < 0,05 frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; #p < 0,05 frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ .

### **4.3 El tratamiento con cacao disminuye la producción de ROS en las células senescentes.**

En este ensayo el cual se detecta ROS mediante la sonda DHE pudimos ver que las células del grupo control viejas que han sido sometidas al estrés oxidativo muestran una gran producción de ROS ya que se produjo una gran fluorescencia, pero por otro lado según se aumentó la concentración de polifenoles con las que fueron tratadas la producción de ROS disminuye hasta ser prácticamente como la del grupo control jóvenes.



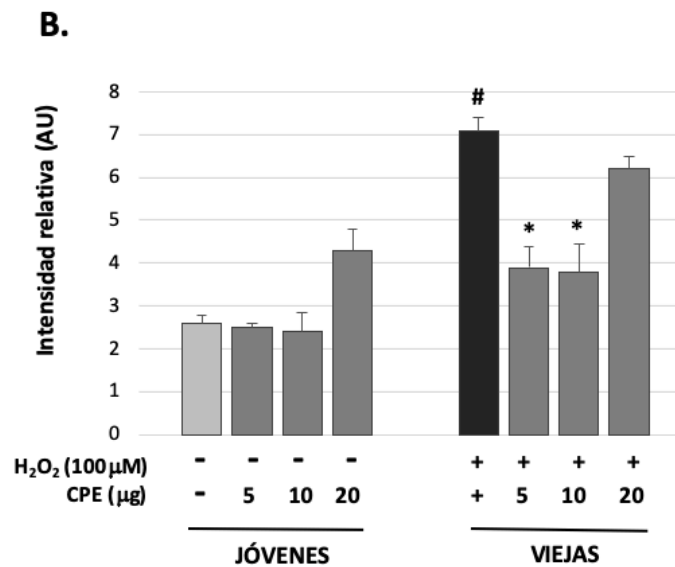
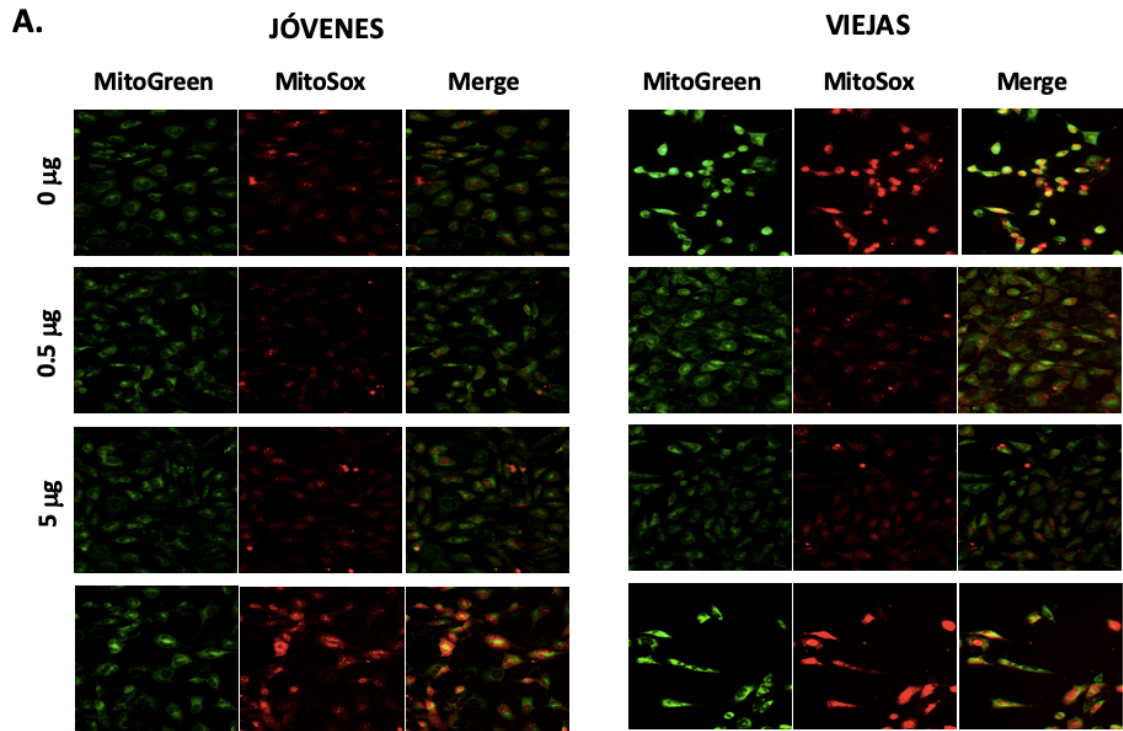


**Figura 13.** El cacao disminuye la producción de ROS en las células auditivas. Imágenes representativas de fotografías de fluorescencia de (A) células HEI-OC1 (x40). Detección de ROS con la sonda fluorescente dihidroethidio, DHE (rojo fluorescente), y el colorante DAPI (un marcador de núcleos celulares con fluorescencia azul) en los cultivos celulares al final de los experimentos. Grupos experimentales: Grupo JÓVEN (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100 $\mu\text{M}$  durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE). (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia para la sonda DHE mediante ImageJ. Los diagramas representan la media  $\pm$  DE de unidades arbitrarias (UA). \* $p < 0,05$  frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; # $p < 0,05$  frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ . (n = 4).

#### **4.4 Los polifenoles del cacao disminuyen la producción de ROS mitocondrial y la masa mitocondrial**

En este ensayo en el cual se usaron los marcadores de fluorescencia Mitochondrial Tracker Green y MitoSOX red que marcan la masa mitocondrial y acumulación de aniones superóxido producidos específicamente por las mitocondrias, podemos observar que las células envejecidas muestran una mayor actividad mitocondrial y acumulación de aniones superóxido. Esta actividad mitocondrial y producción de aniones superóxido se reduce significativamente en las mismas células que fueron previamente tratadas con 5mg/mL de extracto de polifenoles, en el caso de las tratadas con 10mg/mL aumenta débilmente respecto a la concentración anterior y a concentraciones de 20mg/mL de polifenoles podemos ver como aumenta tanto en las células jóvenes como en las viejas.

En el caso del control joven y células tratadas con 5mg/mL vemos que la actividad mitocondrial y la producción de aniones superóxido es débil, y en las células jóvenes tratadas con 10mg/mL aumenta.

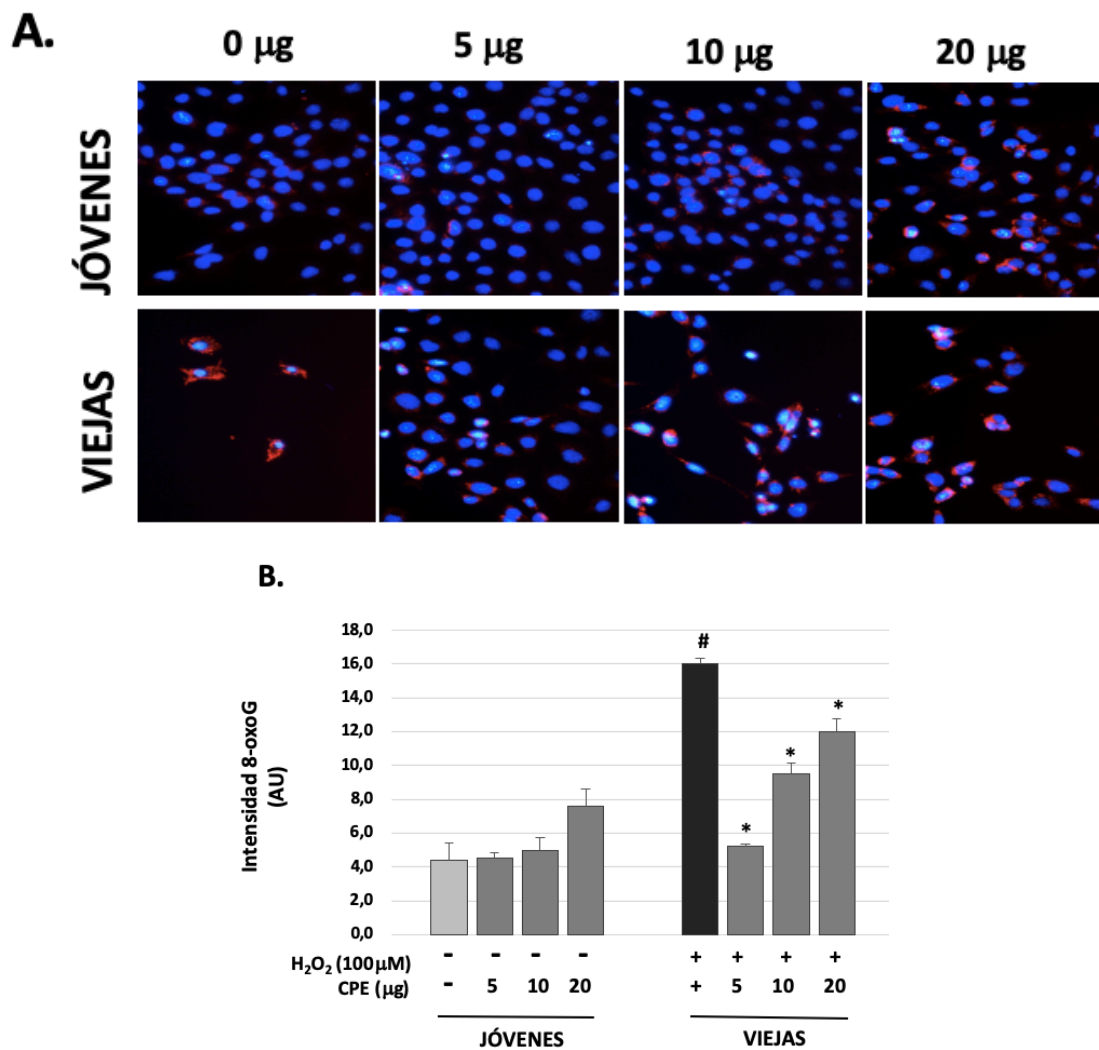


**Figura 14.** El cacao redujo la producción de superóxido derivado de las mitocondrias en las células HEI-OC1. A) Fotografías de fluorescencia representativas de MitoTracker Green (marcador mitocondrial), MitoSOX red (marcador de superóxido mitocondrial) y fusión (amarillo) en HEI-OC1. Grupos experimentales: Grupo JÓVENES (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100 $\mu\text{M}$  durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE). (B) La intensidad de fluorescencia verde, roja y amarilla por célula se calculó con ImageJ y se muestra en el gráfico. \* $p < 0,05$  frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; # $p < 0,05$  frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ . (n = 3).

#### **4.5 Disminución de los marcadores de daño celular en las células senescentes previamente tratadas con cacao.**

En el ensayo de inmunofluorescencia dirigido contra 8-Oxoguanina que es un marcador de daño al ADN por estrés oxidativo, en la cual las guaninas pierden un H y añaden un O en el carbono 8 (Faucher et al., 2012), podemos ver como la fluorescencia es prácticamente la misma en el control joven, y en las células jóvenes tratadas con 5 y 10mg/mL de extracto de polifenoles, y aumenta débilmente en las células tratadas con 20 mg/mL.

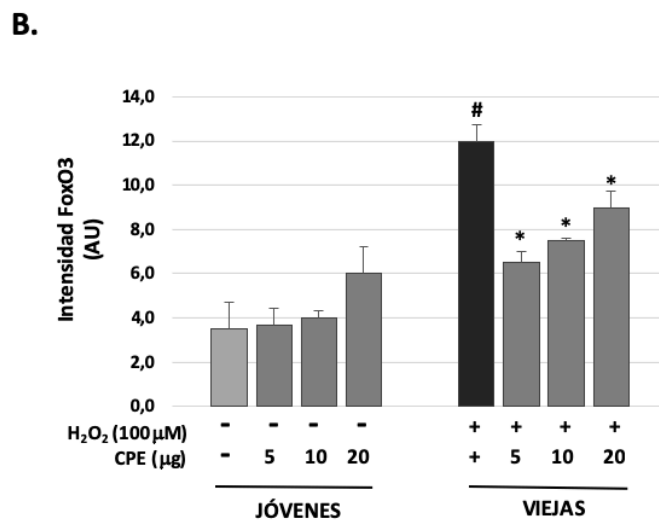
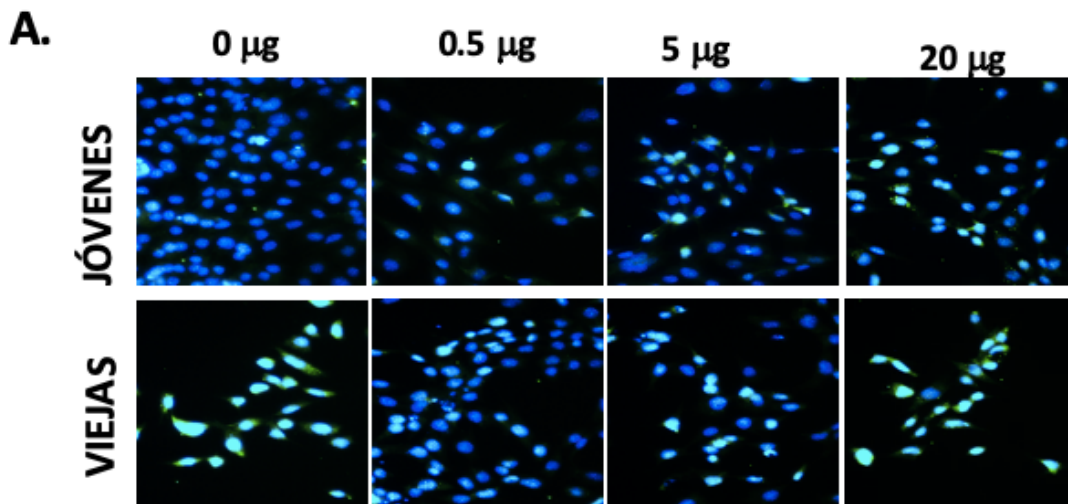
En cambio, en el control de células viejas podemos ver como hay una gran cantidad de 8-Oxoguanina, el cual desaparece en gran medida en las células viejas tratadas con 5 y 10mg/mL y en el caso de las células tratadas con 20 mg/mL, se aprecia una disminución de este marcador más débil que las otras células viejas tratadas con el extracto de polifenoles.



**Figura 15.** El cacao disminuye la producción de 8-oxoG en las células auditivas viejas. (A) Fotografía de fluorescencia representativas de la inmunotinción de 8-oxoG en cultivos de células HEI-OC1 después de los tratamientos. Grupos experimentales: Grupo JÓVEN (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100mM durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE). Los núcleos se identificaron en fluorescencia azul por DAPI y la inmunoreactividad de 8-oxoG se marcó en fluorescencia roja. Se tomaron imágenes representativas al azar de forma ciega. (B) Los gráficos de barras muestran los cambios de intensidad de la inmunofluorescencia mediante Image J en las células HEI-OC1. Los valores representan la media  $\pm \sigma$  unidades arbitrarias (UA) por triplicado. \* $p < 0,05$  frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; # $p < 0,05$  frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ . (n = 4).

En el caso del marcador de daño celular FoxoO3 (del inglés: *Forkhead box protein O3*). El cual es un factor de transcripción que desempeña un papel central en la señalización redox, ya que está implicado en la resistencia al estrés oxidativo a través de la regulación de enzimas antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa. (Gómez-Crisóstomo et al., 2014)

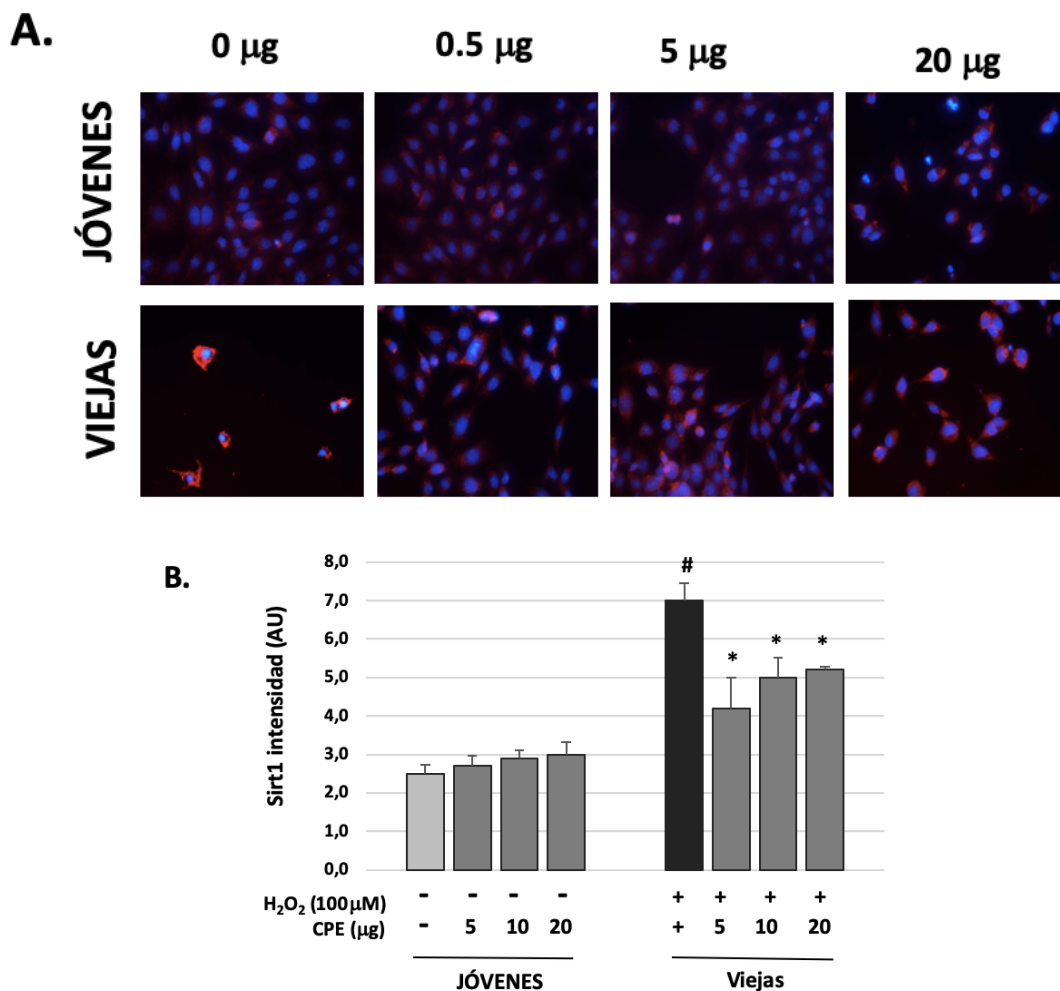
Se observa como en las células jóvenes apenas hay presencia de Foxo 1a, tanto en el control como en las células tratadas con extracto de polifenoles, aumentando tímidamente en las células tratadas con 20µg/mL. En cambio, en el control viejas podemos ver una gran cantidad de fluorescencia verde en el citoplasma lo que nos indica la presencia de Foxo 1a y una gran reducción de está en las células tratadas, aunque se sigue apreciando mínimamente.



**Figura 16.** El cacao disminuye la producción de foxO3 en las células auditivas viejas. (A) Micrografías de fluorescencia representativas de la inmunotinción de foxO3 en cultivos de células HEI-OC1 después de los tratamientos. Grupos experimentales: Grupo JÓVENES (0, control (CTR); 5, 10 y 20 µg/mL de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100mM durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR); 5, 10 y 20 µg/mL de CPE). Los núcleos se identificaron en fluorescencia azul por DAPI y la inmunoreactividad de 8-oxoG se marcó en fluorescencia verde. Se tomaron imágenes representativas al azar de forma ciega. (B) Los gráficos de barras muestran los cambios de intensidad de la inmunofluorescencia mediante Image J

en las células HEI-OC1. Los valores representan la media  $\pm \sigma$  unidades arbitrarias (UA) por triplicado. \*p < 0,05 frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; #p < 0,05 frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ . (n = 4).

Para la proteína Sirtuina 1 (SIRT1) la cual es una histona desacetilasa (HDAC) de clase III, una enzima dependiente de NAD<sup>+</sup> que está profundamente implicada en la regulación génica, el mantenimiento de la estabilidad del genoma, la apoptosis, la autofagia, la senescencia, la proliferación y el envejecimiento, (Alves-Fernandes & Jasiulionis, 2019) podemos ver en la Figura 17 como hay una gran acumulación en las células viejas sin tratar y como en las células viejas tratadas esa acumulación de Sirt1 se reduce, aunque sigue estando más presente que en las células jóvenes control y tratadas con 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por otro lado, en las células jóvenes tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se ve un aumento de la Sirt1 con respecto al control joven.



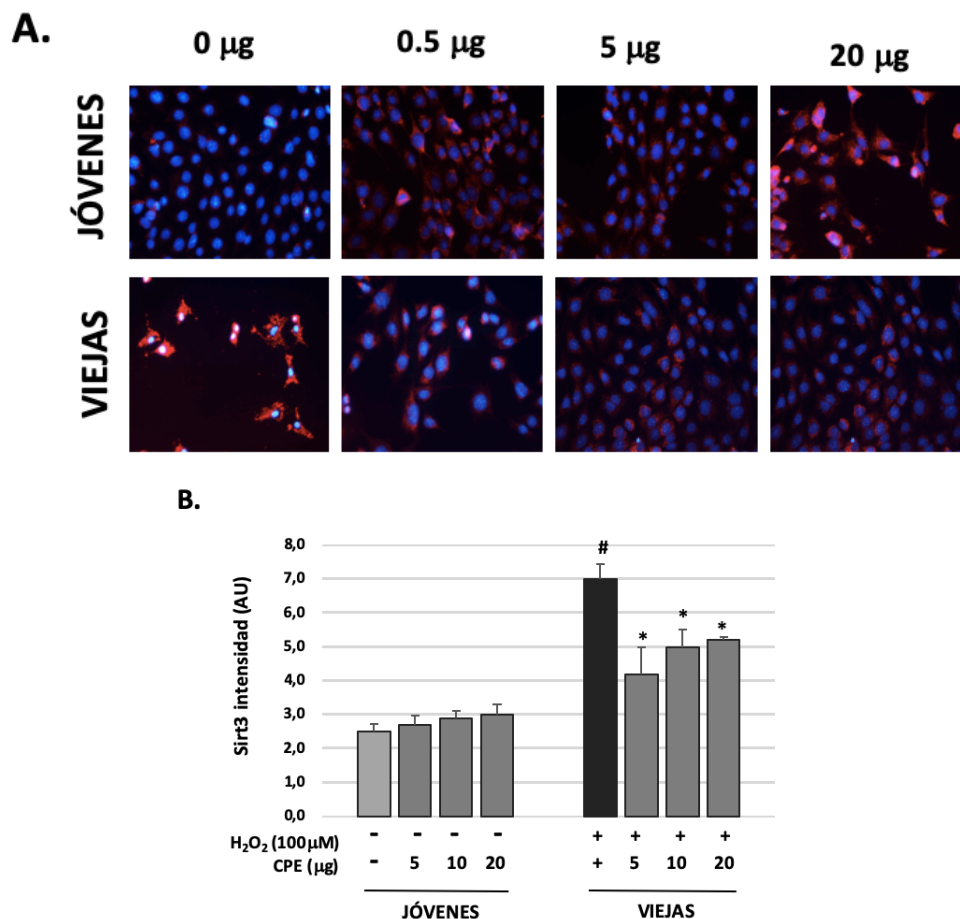
**Figura 17** El cacao aumenta la producción de Sirt-1 en las células auditivas viejas. (A) Fotografía de fluorescencia representativas de Sirt-1 en cultivos de células HEI-OC1 post-tratamiento. Grupos

experimentales: Grupo JÓVENES (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100mM durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE). Los núcleos se identificaron en fluorescencia azul por DAPI y la inmunoreactividad de Sirt-1 se marcó en fluorescencia roja. Se tomaron imágenes representativas al azar de forma ciega. (B-D) Los gráficos de barras muestran los cambios de intensidad de la inmunofluorescencia mediante Image J en las células HEI-OC1. Los valores representan la media  $\pm \sigma$  unidades arbitrarias (UA) por triplicado. \* $p < 0,05$  frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; # $p < 0,05$  frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ . (n = 4).

La sirtuina 3 (SIRT3) la cual es una proteína conservada dependientes de  $\text{NAD}^+$ , que es activada solamente si la célula se encuentra bajo estrés oxidativo ya que, en la mitocondria, la SIRT3 ha mostrado ser clave para la desacetilación y activación del sistema de defensa contra el estrés oxidativo. (Torrens-Mas, 2017)

En este caso podemos ver como hay una gran expresión de SIRT3 en el grupo control viejo con respecto al control joven ya que fueron sometidas a un gran estrés oxidativo, pero una vez que fueron tratadas con las distintas concentraciones de polifenoles la SIRT3 disminuyo hasta alcanzar unos valores parecidos a las células jóvenes tratadas con polifenoles, aunque sigue estando presente.



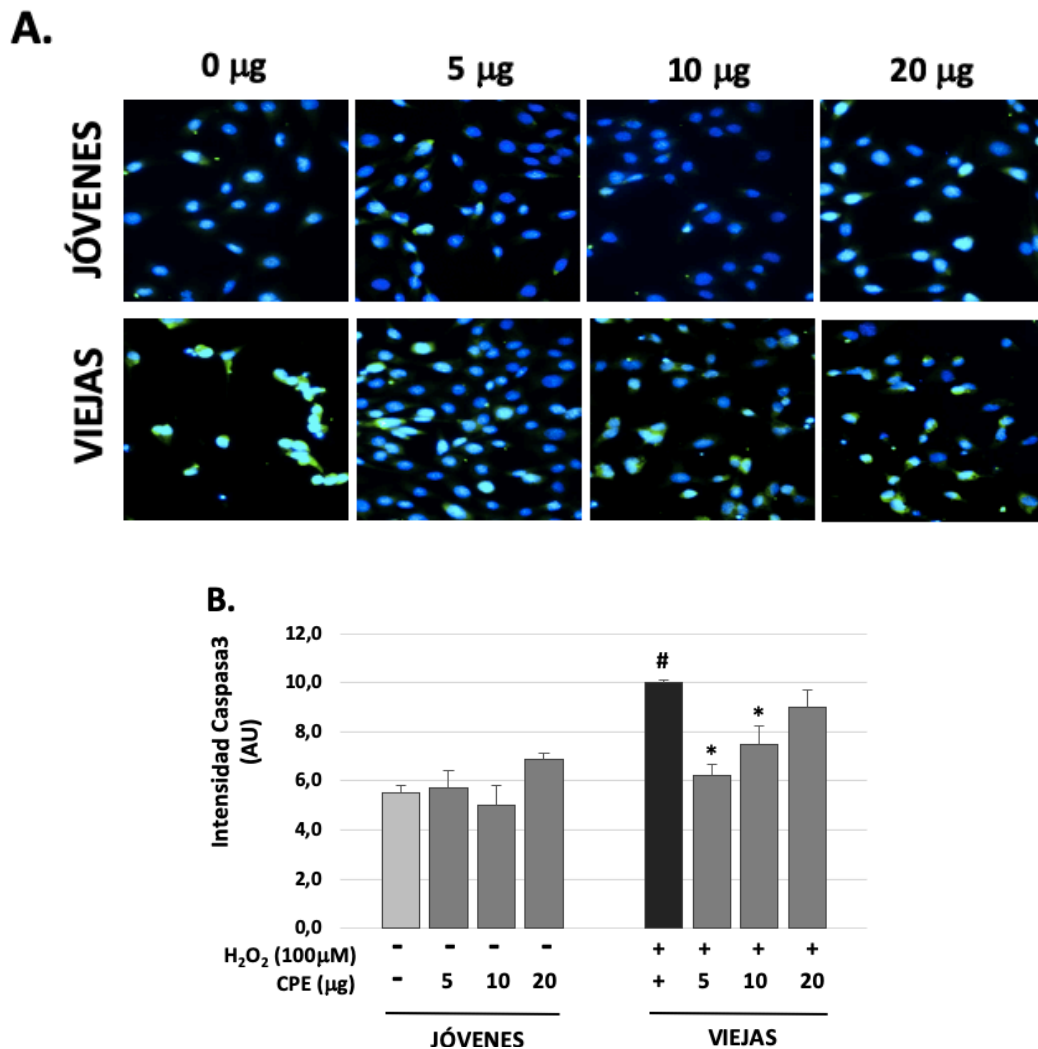


**Figura 18.** El cacao aumenta la producción de Sirt-3 en las células auditivas viejas. (A) Fotografía de fluorescencia representativas de la inmunotinción de Sirt-3 en cultivos de células HEI-OC1 post-tratamiento. Grupos experimentales: Grupo JÓVENES (0, control (CTR); 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100mM durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPE). Los núcleos se identificaron en fluorescencia azul por DAPI y la inmunoreactividad de Sirt-3 se marcó en fluorescencia roja. Se tomaron imágenes representativas al azar de forma ciega. (B-D) Los gráficos de barras muestran los cambios de intensidad de la inmunofluorescencia mediante Image J en las células HEI-OC1. Los valores representan la media  $\pm \sigma$  unidades arbitrarias (UA) por triplicado. \* $p < 0,05$  frente al grupo viejo de 0  $\mu\text{g}$ ; # $p < 0,05$  frente al grupo joven de 0  $\mu\text{g}$ . (n = 4).

Por último, se observó la presencia del marcador de daño celular Caspasa-3 que es una cisteína proteasa la cual es un sello bioquímico de las etapas tempranas y tardías de la apoptosis. (Choudhary et al., 2015)

En el caso del grupo control viejas vemos como una intensa fluorescencia verde con respecto al control joven lo que nos indica la presencia de caspasa-3, esto quiere decir que esas células debido al insulto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> han entrado en apoptosis. En cambio, en las células viejas tratadas con polifenoles no vemos tanta presencia de caspasa-3,

exceptuando las tratadas con 20µg/mL que se observa más fluorescencia al igual que en las jóvenes tratadas con esta concentración de polifenoles, lo que indica la toxicidad del extracto de polifenoles a concentraciones altas.



**Figura 19.** El cacao disminuye la producción de Caspasa-3 en las células auditivas viejas. (A) Fotografías de fluorescencia representativas de la inmunotinción de Caspasa-3 en cultivos de células HEI-OC1 después de los tratamientos. Grupos experimentales: Grupo JÓVENES (0, control (CTR); 5, 10 y 20 µg/mL de CPE) y grupo VIEJAS (senescencia celular inducida con 100mM durante 1h en todos los grupos: (0, control (CTR); 5, 10 y 20 µg/mL de CPE). Los núcleos se identificaron en fluorescencia azul por DAPI y la inmunoreactividad de 8-oxoG se marcó en fluorescencia roja. Se tomaron imágenes representativas al azar de forma ciega. (B) Los gráficos de barras muestran los cambios de intensidad de la inmunofluorescencia mediante Image J en las células HEI-OC1. Los valores representan la media  $\pm$   $\sigma$  unidades arbitrarias (UA) por triplicado. \* $p < 0,05$  frente al grupo de control antiguo (CTR); # $p < 0,05$  frente al grupo de control joven (CTR). (n = 4).

## 5. Discusión.

El objetivo del estudio fue examinar el efecto preventivo de los polifenoles del cacao para prevenir el deterioro de las células de oído interno durante el envejecimiento. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de polifenoles tiene efectos antioxidantes preventivos frente al estrés oxidativo en células del oído interno, ya que disminuye la aparición de distintos marcadores de daño celular, cambios morfológicos en las células, actividad mitocondrial o producción de ROS entre otros, los cuales son propios de las células senescentes y por lo tanto del envejecimiento celular. (Facchin et al., 2018a)

En el estudio realizado por Martín y col, 2014 en el cual comprueban los efectos de las catequinas extraídas de cacao, sobre la línea celular Ins-1E pertenecientes a páncreas, se comprobó que las células expuestas a concentraciones bajas de polifenoles no mostraron ningún aumento en la concentración de ROS, lo que indica que las catequinas no provocaron estrés o daño celular. Además, en este estudio se comprobó el efecto preventivo de la catequina en células expuestas a estrés oxidativo y se pudo observar como se redujo el daño celular y la viabilidad de las células se recuperó completamente hasta alcanzar valores similares a las células que no fueron expuestas al estrés oxidativo. (M. Á. Martín et al., 2014)

En otro estudio también realizado por Martín y col, 2008 en el que se comprueban los efectos antioxidantes de los polifenoles del cacao, pero esta vez sobre células HepG2, los resultados que obtuvieron mostraron que el extracto de polifenoles no indujo daño celular además que disminuyo en gran medida la producción de ROS con respecto al control.

Por otro lado, las células que fueron expuestas a estrés oxidativo disminuyeron la viabilidad celular en un 50-60%, pero si esas mismas células se trataban con el extracto de polifenoles se reducía significativamente el daño celular y aumentó la viabilidad celular hasta niveles parecidos a las células no tratadas. (M. A. Martín et al., 2008). Estos datos se corroboran en otro estudio realizado por Martín y col, 2010, en el cual los resultados del tratamiento con polifenoles sobre células HepG2 son similares con

respecto a la viabilidad celular en células expuestas a estrés oxidativo mediante 100 $\mu$ M de t-BOOH.(M. Á. Martín et al., 2010)

Los resultados de los tres estudios anteriores coinciden en gran medida con los resultados obtenidos en nuestro estudio, aunque se utilice distintas líneas celulares, ya que en nuestros resultados se observa que el tratamiento con extracto de polifenoles sobre células expuestas a estrés oxidativo aumenta la viabilidad y reduce el daño celular con respecto a las células no tratadas. Por otro lado, en nuestro estudio hemos visto como la viabilidad disminuía en células tratadas con 20  $\mu$ g/mL de extracto de polifenoles y en el estudio de Martín y col, 2008 la viabilidad de sus células no disminuía a concentraciones mayores (50  $\mu$ g/mL) de extracto de polifenoles del cacao. Esto puede deberse a que la línea celular HEI-OC1 es más vulnerable al tratamiento con polifenoles a altas concentraciones que la línea celular HepG2.

Además de la disminución de la viabilidad celular, otros marcadores de senescencia celular son los cambios morfológicos. En el estudio realizado por Facchin y col (2018) las líneas celulares hASCs y hWJ-MSCs sufrieron cambios morfológicos tras haber sido expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones de entre 100 y 250 $\mu$ M (Facchin et al., 2018b). Estos resultados coinciden con los obtenidos con nuestras células viejas control, pero podemos ver como en las células tratadas con 5 y 10 $\mu$ g/mL de polifenoles los cambios morfológicos desaparecen hasta el punto de no diferenciar estas células con el control jóvenes lo que nos dice que el tratamiento con polifenoles previene los cambios morfológicos debidos al estrés oxidativo.

Pero por otro lado vemos como las células tratadas con el extracto de polifenoles de 20 $\mu$ g/mL sufren cambios morfológicos tanto en las expuestas al insulto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como las que no, lo que indica que las concentraciones elevadas del tratamiento con polifenoles son tóxicas para las células HEI-OC1.

Los organismos al envejecer sufren una acumulación de ROS, aumentando el estrés oxidativo y disminuyendo los sistemas antioxidantes del organismo, produciéndose un desequilibrio que provoca que la célula entre en senescencia (da Costa et al., 2016), por ello es necesario conocer si las células expuestas al tratamiento de polifenoles producirán menos ROS, que las células no tratadas. En nuestros resultados se observó

como las células senescentes o envejecidas y que previamente se trataron con polifenoles reducen significativamente la producción de ROS, hasta alcanzar niveles similares a las células no tratadas del grupo jóvenes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martín y col, 2008 aunque en su caso utilizó 200µM de t-BOOH y el tratamiento de polifenoles fue de 0,5 y 5 µg/mL sobre células HepG2. En otro estudio realizado también por Martín y col, 2010 obtuvieron los mismos resultados que, en el presente estudio, pero esta vez utilizando una concentración de 100µM de t-BOOH y las concentraciones de polifenoles descritas anteriormente. Por lo que queda demostrado que la exposición previa a polifenoles previene la acumulación de especies reactivas del oxígeno y por tanto la senescencia de células del oído interno.

Las mitocondrias son las principales responsables de la acumulación de estrés oxidativo a lo largo de los años ya que son las encargadas de la producción de energía, pero además producen ROS que se acumulan como subproducto de la cadena transportadora de electrones causando daños mitocondriales. Las mitocondrias dañadas producen ROS en forma de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales aceleran más la producción de ROS (Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018; J. Park et al., 2011). Como afirma Makoto y col, 2019 en su estudio, los polifenoles previenen la apoptosis mediante la regulación directa del sistema de apoptosis en las mitocondrias y mejoran la biogénesis mitocondrial (Naoi et al., 2019).

Por ello, comprobamos si las mitocondrias producían menos ROS tras el tratamiento con polifenoles del cacao y si la masa y actividad mitocondrial variaba. En nuestro estudio se comprobó que la producción de ROS, la masa y actividad mitocondrial disminuía con el tratamiento de polifenoles a concentraciones de 5 y 10 µg/mL con respecto al control jóvenes, por tanto, el tratamiento con polifenoles es beneficioso para evitar el daño mitocondrial y la acumulación de ROS mitocondrial. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Dergacheva y col, 2020 en el que estudian la capacidad de distintos polifenoles para reducir la producción de ROS mitocondrial en levadura. (Dergacheva et al., 2020)

Otra forma de comprobar si los polifenoles previenen el estrés oxidativo fue estudiando marcadores de daño celular como la proteína 8-oxoguanina, marcador de daño

oxidativo al ADN (Faucher et al., 2012), que en el presente estudio las células viejas tratadas con polifenoles a concentraciones de 5 y 10µg/mL muestran una reducción de la 8-oxoguanina con respecto a las células viejas no tratadas, lo que indica que los polifenoles han reducido la producción de 8-oxoguanina por la oxidación de guaninas, lo que quiere decir que el ADN ha sufrido menos modificaciones ya que la célula estuvo expuesta a menor estrés oxidativo.

Otro marcador de daño celular es FoxO 1a, que participa en la regulación del ciclo celular mediante la regulación de la transcripción de la ciclina D, también está implicado en la resistencia al estrés oxidativo a través de la regulación de enzimas antioxidantes como la catalasa y manganeso superóxido dismutasa además está vinculado a los procesos apoptóticos mediante la modulación de la expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. (Gómez-Crisóstomo et al., 2014)

Observamos como FoxO 1a se expresaba menos en las células viejas tratadas con 5µg/mL con respecto al control viejas, lo que indica que los polifenoles previenen el estrés oxidativo ya que FoxO1a se expresaría más en presencia de estrés al estar implicado en la resistencia al estrés oxidativo a través de la regulación de enzimas antioxidantes.

Para la proteína Sirtuina 1 (SIRT1) la cual es una histona desacetilasa (HDAC) de clase III, una enzima dependiente de NAD<sup>+</sup>, profundamente implicada en la regulación génica, el mantenimiento de la estabilidad del genoma, la apoptosis, la autofagia, la senescencia, la proliferación y el envejecimiento, (Alves-Fernandes & Jasiulionis, 2019)

La SIRT1 también es importante para el recambio de mitocondrias defectuosas por mitofagia. (Luen Tang, 2016). La SIRT1 como desacetilasa, participa directa o indirectamente en la regulación en vías de señalización mediante la desacetilación de ciertas proteínas clave para retrasar la senescencia celular, esto quiere decir que en células expuestas a estrés oxidativo se vera más expresada (Chen et al., 2020), por ello es importante conocer si disminuye su expresión en células expuestas al tratamiento con polifenoles. Pero además en el estudio realizados por Sarubbo y col, 2018 afirma que los polifenoles ayudan a la expresión de la sirtuina.

En nuestros resultados vemos que la expresión de sirtuina 1 se ve disminuida en las células tratadas con el extracto de polifenoles con respecto al control viejas, pero sigue estando presente. Por otro lado, en la mitocondria la SIRT3 ha mostrado ser clave para la desacetilación y activación del sistema de defensa contra el estrés oxidativo, incluyendo enzimas antioxidantes y enzimas clave para el correcto funcionamiento mitocondrial y la síntesis de ATP (Torrens-Mas, 2017),

Por ello en nuestros resultados vemos como en las células control viejas la sirtuina3 esta sobrepresada ya que las células han sido expuestas a un alto estrés oxidativo, y en las células tratadas con polifenoles tanto jóvenes como viejas vemos como sigue habiendo expresión de SIRT3 en menor proporción que en control viejas pero más que en el control jóvenes, esto puede deberse a que en estudios como el realizado por Chong Zhao y col, 2016 y Zheng 2018 se demuestra que los polifenoles aumentan la expresión de SIRT3. (Zhao et al., 2016; Zheng et al., 2019)

Por lo tanto, la SIRT1 y 3 se expresa en las células tratadas que han sido expuestas a estrés oxidativo como en las que no han sido expuestas a estrés ya que los polifenoles potencian su expresión.

Por último, se observó la presencia del marcador de daño celular Caspasa-3 que es una cisteína proteasa la cual es un sello bioquímico de las etapas tempranas y tardías de la apoptosis. (Choudhary et al., 2015; Crowley & Waterhouse, 2016).

En nuestros resultados comprobamos como las células del control viejas muestran una gran cantidad de caspasa-3 lo que indica que esas células están en fase de apoptosis, es decir que el estrés oxidativo induce la apoptosis, en cambio las células tratadas con 5 y 10µg/mL de polifenoles vemos como la presencia de las caspasa-3 es mucho menor, lo que indica que los polifenoles protegen contra la apoptosis mediante la inhibición de la activación de la caspasa-3. Estos resultados concuerdan con los del estudio realizado por Diao y col, 2019 en el que comprueba la capacidad antioxidante de los polifenoles del té en hígado dañado de ratones. (Diao et al., 2020)

## 6. Conclusión.

Las conclusiones del estudio son:

- El tratamiento preventivo con polifenoles del cacao aumenta la viabilidad celular en células del oído interno senescentes.
- El tratamiento con polifenoles del cacao previene los cambios morfológicos en células del oído interno senescentes
- La exposición previa a polifenoles reduce la producción de especies reactivas del oxígeno en las células del oído interno envejecidas.
- El tratamiento con polifenoles reduce la masa mitocondrial de células del oído interno envejecidas, su actividad y la producción de aniones superóxido.
- Disminuyen los marcadores de daño celular en las células de oído interno senescentes tratadas previamente con cacao y que fueron expuestas a estrés oxidativo.

En conclusión, el tratamiento a concentraciones adecuadas del extracto de polifenoles del cacao puede ser preventivo para la presbiacusia provocada por la senescencia celular, ya que como podemos comprobar en los resultados, los polifenoles reducen la aparición de distintos procesos celulares y moleculares relacionados con el envejecimiento celular causado por el estrés oxidativo.

Por ello, es necesario seguir estudiando la capacidad antioxidante de estos compuestos para desarrollar nuevos fármacos y terapias que prevengan enfermedades relacionadas con la senescencia celular y por tanto con la edad.



## 7. Bibliografía.

- Alves-Fernandes, D. K., & Jasiulionis, M. G. (2019). The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3153. <https://doi.org/10.3390/ijms20133153>
- Bart-Plange, A., & Baryeh, E. A. (2003). The physical properties of Category B cocoa beans. *Journal of Food Engineering*, 60(3). [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00452-1)
- Bernatoniene, J., & Kopustinskiene, D. (2018). The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040965>
- Bowl, M. R., & Dawson, S. J. (2019). Age-Related Hearing Loss. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033217>
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 21, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Chen, C., Zhou, M., Ge, Y., & Wang, X. (2020). SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, 187, 111215. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111215>
- Choudhary, G. S., Al-harbi, S., & Almasan, A. (2015). *Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis* (pp. 1–9). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_1)
- Crowley, L. C., & Waterhouse, N. J. (2016). Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb.prot087312. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087312>
- da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Research Reviews*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>
- del Mar Rivas-Chacón, L., Martínez-Rodríguez, S., Madrid-García, R., Yanes-Díaz, J., Riestra-Ayora, J. I., Sanz-Fernández, R., & Sánchez-Rodríguez, C. (2021). Role of Oxidative Stress in the Senescence Pattern of Auditory Cells in Age-Related Hearing Loss. *Antioxidants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antiox10091497>
- Dergacheva, D. I., Klein, O. I., Gessler, N. N., Isakova, E. P., Deryabina, Y. I., & Nikolaev, A. v. (2020). Influence of Natural Polyphenols on Isolated Yeast *Dipodascus magnusii* Mitochondria. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 490(1), 12–15. <https://doi.org/10.1134/S1607672920010044>
- Diao, J., Ou, J., Dai, H., Li, H., Huang, W., Hua, H., Xie, T., Wang, M., & Yang, Y. (2020). Antioxidant and Antiapoptotic Polyphenols from Green Tea Extract Ameliorate CCl4-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 26(10), 736–744. <https://doi.org/10.1007/s11655-019-3043-5>
- Ekdale, E. G. (2016). Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of Anatomy*, 228(2). <https://doi.org/10.1111/joa.12308>
- Facchin, F., Bianconi, E., Romano, M., Impellizzeri, A., Alviano, F., Maioli, M., Canaider, S., & Ventura, C. (2018a). Comparison of Oxidative Stress Effects on Senescence Patterning of Human Adult and Perinatal Tissue-Derived Stem Cells in Short and

- Long-term Cultures. *International Journal of Medical Sciences*, 15(13).  
<https://doi.org/10.7150/ijms.27181>
- Faucher, F., Doublíé, S., & Jia, Z. (2012). 8-Oxoguanine DNA Glycosylases: One Lesion, Three Subfamilies. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6).  
<https://doi.org/10.3390/ijms13066711>
- Folin Ciocalteu Phenolic Content Quantification Assay Kit*. (n.d.). Retrieved October 7, 2021, from [https://www.cosmobiousa.com/content/document/bqckit/bqc-kb03006\\_polyphenol-assay-kit-folin-ciocalteu\\_manual.pdf](https://www.cosmobiousa.com/content/document/bqckit/bqc-kb03006_polyphenol-assay-kit-folin-ciocalteu_manual.pdf)
- Gates, G. A., & Mills, J. H. (2005). Presbycusis. *The Lancet*, 366(9491).  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67423-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67423-5)
- Giorgio, V., Guo, L., Bassot, C., Petronilli, V., & Bernardi, P. (2018). Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*, 70.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>
- Gómez-Crisóstomo, N. P., Rodríguez Martínez, E., & Rivas-Arancibia, S. (2014). Oxidative Stress Activates the Transcription Factors FoxO 1a and FoxO 3a in the Hippocampus of Rats Exposed to Low Doses of Ozone. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/805764>
- Halib, H., Ismail, A., Mohd Yusof, B.-N., Osakabe, N., & Mat Daud, Z. A. (2020). Effects of Cocoa Polyphenols and Dark Chocolate on Obese Adults: A Scoping Review. *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123695>
- Heine, P. A. (2004). Anatomy of the ear. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(2). <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.10.003>
- Hussain, B., Ali, M., Qasim, M., Masoud, M. S., & Khan, L. (2017). Hearing impairments, presbycusis and the possible therapeutic interventions. *Biomedical Research and Therapy*, 4(4), 1228. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v4i4.159>
- Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., & Li, M. (2020a). Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species—A Review. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040917>
- Kalinec, G. M., Park, C., Thein, P., & Kalinec, F. (2016). Working with Auditory HEI-OC1 Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 115. <https://doi.org/10.3791/54425>
- Kalinec, G., Thein, P., Park, C., & Kalinec, F. (2016). HEI-OC1 cells as a model for investigating drug cytotoxicity. *Hearing Research*, 335. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.02.019>
- Kauffman, M., Kauffman, M., Traore, K., Zhu, H., Trush, M., Jia, Z., & Li, Y. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C., & Tornero, A. (2005). Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International*, 11(3). <https://doi.org/10.1177/1082013205054498>
- Luen Tang, B. (2016). Sirt1 and the Mitochondria. *Molecules and Cells*, 39(2), 87–95. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2318>
- Martín, M. Á., Fernández-Millán, E., Ramos, S., Bravo, L., & Goya, L. (2014). Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(3), 447–456. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300291>
- Martín, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado Serrano, A. B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., & Goya, L. (2008). Protection of Human HepG2 Cells against Oxidative

- Stress by Cocoa Phenolic Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17). <https://doi.org/10.1021/jf801744r>
- Martín, M. Á., Serrano, A. B. G., Ramos, S., Pulido, M. I., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(3). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.10.009>
- Monteiro, L. de B., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., & Moraes-Vieira, P. M. M. (2020). Using flow cytometry for mitochondrial assays. *MethodsX*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100938>
- Naoui, M., Wu, Y., Shamoto-Nagai, M., & Maruyama, W. (2019). Mitochondria in Neuroprotection by Phytochemicals: Bioactive Polyphenols Modulate Mitochondrial Apoptosis System, Function and Structure. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2451. <https://doi.org/10.3390/ijms20102451>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5). <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Park, C., Thein, P., Kalinec, G., & Kalinec, F. (2016). HEI-OC1 cells as a model for investigating prestin function. *Hearing Research*, 335. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.02.001>
- Park, J., Lee, J., & Choi, C. (2011). Mitochondrial Network Determines Intracellular ROS Dynamics and Sensitivity to Oxidative Stress through Switching Inter-Mitochondrial Messengers. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023211>
- Paul, C., & Brookes, B. (2015). The Rationalization of Unethical Research: Revisionist Accounts of the Tuskegee Syphilis Study and the New Zealand “Unfortunate Experiment.” *American Journal of Public Health*, 105(10). <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.302720>
- Ruskovska, T., Maksimova, V., & Milenkovic, D. (2020). Polyphenols in human nutrition: from the *in vitro* antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. *British Journal of Nutrition*, 123(3). <https://doi.org/10.1017/S0007114519002733>
- 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(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008699>
- Tanabe, K., Tamura, Y., Lanaspa, M. A., Miyazaki, M., Suzuki, N., Sato, W., Maeshima, Y., Schreiner, G. F., Villarreal, F. J., Johnson, R. J., & Nakagawa, T. (2012). Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 303(9). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00227.2012>
- Torrens-Mas, M. R. M. S.-S. J. (2017). Importancia de la sirtuina 3 en el estrés oxidativo y el cáncer. *Medicina Balear*, 32(2), 47–52.
- Varela-Nieto, I., & Rivera, T. (2010, September). Presbiacusia. *LYCHNOS Cuaderno de La Fundación General CSIC*, 20–25.
- Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2018). Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/pbi.12848>

- Zhao, C., Sakaguchi, T., Fujita, K., Ito, H., Nishida, N., Nagatomo, A., Tanaka-Azuma, Y., & Katakura, Y. (2016). Pomegranate-Derived Polyphenols Reduce Reactive Oxygen Species Production via SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/2927131>
- Zheng, Y., Shi, B., Ma, M., Wu, X., & Lin, X. (2019). The novel relationship between Sirt3 and autophagy in myocardial ischemia–reperfusion. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5488–5495. <https://doi.org/10.1002/jcp.27329>