



Estudi d'un Model d'Exposició Subcrònica a IDPN en la Rata: Patologia Vestibular i Reparació

Lara Sedó Cabezón



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

**Estudi d'un Model d'Exposició
Subcrònica a IDPN en la Rata:
Patologia Vestibular i Reparació**

Tesi doctoral presentada per

Lara Sedó Cabezón

L'Hospitalet de Llobregat, desembre 2014



Tesi presentada per **Lara Sedó Cabezón**, llicenciada en Biologia, per optar al títol de doctora per la Universitat de Barcelona.

Programa de doctorat en Biomedicina.
Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina.
Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi **Estudi d'un Model d'Exposició Subcrònica a IDPN en la Rata: Patologia Vestibular i Reparació** ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Jordi Llorens Baucells, a la Unitat de Fisiologia del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona (Campus de Bellvitge).

El director de la tesi,

La interessada,

Dr. Jordi Llorens Baucells
Professor Catedràtic
Dept. Ciències Fisiològiques II
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Lara Sedó Cabezón

L'Hospitalet de Llobregat, desembre 2014

Lara Sedó-Cabezón, 2014

Aquest treball de tesi ha estat finançat amb els següents projectes:

- **Projecte BFU2009-06945** *«Toxicological Basis of Nitrile-Induced Audio-Vestibular Degeneration»*, del “Ministerio de Ciencia e Innovación”.
- **Projecte BFU2012-31164** *«Vestibular Damage and Repair in Chronic Ototoxicity: Cellular Stages, Physiological Deficits and Molecular Mechanisms»*, del “Ministerio de Economía y Competitividad”.

Als meus pares, al meu germà i a la meva parella
per estar sempre al meu costat

AGRAÏMENTS

Ja han passat sis anys des de que vaig arribar al laboratori i vaig començar la tesina del màster, qui m'ho havia de dir que acabaria llegint la meva pròpia tesi. Tots aquests anys han estat plens de grans moments i experiències que m'han fet créixer com a persona. Així doncs, mirant de nou enrere i sense voler oblidar-me de ningú dels que heu recorregut aquest camí al meu costat, us voldria agrair el suport rebut.

En primer lloc, al **Jordi** per haver-me donat la oportunitat de realitzar la tesina del màster, fet que em va encoratjar a realitzar la tesi, gràcies una altra vegada per la oportunitat de realitzar la tesi en aquest tema tan innovador i interessant.

En segon lloc, als meus companys de laboratori, que tot hi ser un grup petit, en aquests anys he tingut la sort de poder coincidir amb tots vosaltres. Primer a la **Carla**, amb qui tot i que vam coincidir poc pel laboratori ens vam entendre des del primer moment, per la seva energia i vitalitat contagioses. A la **Sandra**, per la seva bondat i per haver-me ensenyat les disseccions vestibulars. Al **Gerard**, qui va deixar un gran buit al laboratori quan va decidir creuar el “xarco” per amor, per les estones de dinar i les tardes que vam passar junts al laboratori. Als “otorrinos”: a l'**Ivan**, la **Nines** i sobretot a l'**Àngela**, la persona més optimista que conec, pel període intens però curt que vam passar al laboratori abans que arribés el petit Martí. Al **Pere**, per permetre'm col·laborar en altres projectes més enllà de la tesi. A l'**Enric**, pel bon caliu que regna al laboratori les tardes de dilluns quan ens visita. A la **Paulina**, amb qui he compartit la recta final de la tesi, per la companyia i els consells. A la **Maria José**, al **Josep Maria** i al **Joan**. I per últim a tots els “nens” que han passat en algun moment pel laboratori, ja sigui ens pràctiques d'estiu, treballs de fi de grau o treballs de fi de màster: a la **Cris**, la **Roser**, la **Carol**, el **Joan**, la **Melo**, la

Silvia, la **Txell**, la **Erin**, la **Maria**, el **Beltrán**, el **Marc** i la **Sandra**, pel vostre granet de sorra.

També voldria agrair a les ja doctores, **Natàlia López** i **Anna Nualart**, així com a la **Fabi**, companyes de màster i departament, les estones de metro cap al màster, les xerrades al passadís i els bons moments passats juntes.

A tots els **membres del departament**, amb qui he coincidit pel passadís o a l'office, gràcies per dedicar-me un somriure i per preguntar-me sempre com avançava la tesi. Especialment a l'**Alejandro** per ensenyar-me la recepta de la gelatina i introduir-me en el món dels *zebrafish* i a l'**Eddie**, gran investigador i millor persona, pels moments passats junts a l'estabulari posant a punt les colònies.

A tota la gent dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona que han fet possible aquesta tesi. Al **Benja**, de la Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, per ensenyar-me els secrets del confocal. A l'**Almudena**, de la Unitat de Microscòpia Electrònica de Transmissió, per la seva professionalitat. I a l'**Aranzazu**, de la Unitat de Microscòpia Electrònica de Rastreig, per tenir cura de les meves mostres.

A tots els companys de la Unitat d'Experimentació Animal de Bellvitge, amb qui vaig compartir tres anys, gràcies per encoratjar-me a començar la tesi: a l'**Álvaro**, la **Natacha**, el **Pedro** i la **Pilar**. No em voldria oblidar de la **Montse** i la **Puri** ni de les becàries i els ajudants que van passar quan hi era.

Als meus actuals companys de la Unitat d'Experimentació Animal de Psicologia i Farmàcia: a l'**Ana**, el **David**, la **Marta**, la **Paula**, a tots/es els/les becaris/es amb qui he coincidit, a la **Luisa** i la **Susi**, i molt en especial a la **Tere** per animar-me a seguir sempre endavant.

Tampoc em voldria oblidar del personal del Punt d'Informació de Bellvitge, així com del personal de Manteniment i Seguretat, peces clau en els engranatges de Bellvitge.

A tota la meva família, moltes gràcies per la vostra paciència i comprensió en els moments de més estrès. Als meus pares, **Romualdo** i **Julia**, per haver-me ensenyat a ser constant, i que amb esforç i voluntat es poden aconseguir els objectius, sou el meu model a seguir. Al meu germà, **Marc**, per estar en tot moment al meu costat, tot i haver estat separats per milers i milers de quilòmetres i uns quants fusos horaris. Sé que sempre podré comptar amb tu, i tu també ho saps. Als meus **avis** per interessar-se sempre per la tesi i animar-me a seguir endavant. I als que ja no hi són, però segueixen presents en el record.

I per últim a la meva parella, **Roger**, moltes moltíssimes gràcies per haver fet aquest tros de camí al meu costat, camí que no sempre ha estat fàcil, però junts hem sabut superar els obstacles i seguir endavant, aquesta també és la teva tesi. Encara ens queda un llarg viatge per recórrer, i el vull fer al teu costat.

ÍNDEX

1. ABREVIATURES	1
2. INTRODUCCIÓ	5
2.1. El Sistema Vestibular: Generalitats	7
2.1.1. Anatomia	7
2.1.2. Epitelis Vestibulars	9
2.2. Les Cèl·lules Ciliades i la seva Innervació	13
2.2.1. Característiques de les Cèl·lules Ciliades	13
2.2.2. Tipus de Cèl·lules Ciliades	15
2.2.3. El Sistema Eferent	17
2.2.4. El Sistema Aferent	18
2.2.5. Unions Septades	19
2.2.6. Proteïnes del Contacte Aferent	21
2.2.7. Proteïnes de la Neurotransmissió	25
2.3. Disfunció Vestibular	30
2.3.1. Conseqüències de la Disfunció del Sistema Vestibular	30
2.4. Els nitrils	34
2.4.1. Generalitats dels Nitrils	34
2.4.2. Ototoxicitat dels Nitrils	35
2.4.3. Característiques de l'IDPN	36
2.5. Ototoxicitat	38
2.5.1. Efecte de l'Ototoxicitat sobre les Cèl·lules Ciliades	38
2.5.2. Ototoxicitat de l'IDPN	40
2.5.3. Models Experimentals en Recerca Ototòxica	42
2.5.4. Apoptosis, necrosis i extrusió	44

3. OBJECTIUS	49
4. MATERIALS I MÈTODES	53
4.1. Compostos Químics	55
4.2. Animals	57
4.3. Disseny Experiment	60
4.3.1. Avaluació Comportamental de la Disfunció Vestibular	60
4.3.2. Avaluació Histològica dels Epitelis Vestibulars	65
4.4. Anàlisi d'Imatge	76
4.4.1. Quantificació de Caspr1 i KCNQ4 a la cara interna i externa del calze de les cèl·lules ciliades de tipus I	76
4.4.2. Quantificació de la fluorescència total de Caspr1 i Tenascina-C de les cèl·lules ciliades de tipus I	77
4.4.3. Quantificació dels contactes sinàptics Ribeye, PSD-95 i GluR2 de les cèl·lules ciliades de tipus I i de les de tipus II	78
4.5. Anàlisi Estadístiques	80
5. RESULTATS	81
CAPÍTOL I: MODEL ANIMAL	83
5.1. Efecte de l'IDPN sobre el pes corporal dels animals	85
5.2. Ingesta d'aigua i Dosi d'IDPN	86
5.3. Avaluació Comportamental de la Disfunció Vestibular causada per l'IDPN (VDR)	88
CAPÍTOL II: ULTRAESTRUCTURA	93
5.4. Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM)	95
5.4.1. SEM: Efecte de l'IDPN 20mM, 4 setmanes d'exposició	96
5.4.2. SEM: Efecte de l'IDPN 20mM, 6 setmanes d'exposició	100

5.4.3.	SEM: Efecte de l'IDPN 20mM, 10 setmanes d'exposició	104
5.4.4.	SEM: Efecte de l'IDPN 10mM, 10 setmanes d'exposició	108
5.5.	Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM)	111
CAPÍTOL III: CARACTERITZACIÓ MOLECULAR		121
5.6.	Immunohistoquímica i Microscòpia de fluorescència Confocal	123
5.6.1.	Efecte de l'IDPN 20mM sobre les Unions Septades	123
5.6.2.	Efecte de l'IDPN 10mM sobre les Unions Septades	132
5.6.3.	Efecte de l'IDPN 20mM sobre l'aparell de Neurotransmissió	138
6.	DISCUSSIÓ	147
6.1.	Model Animal	149
6.2.	Ultraestructura	151
6.3.	Caracterització Molecular	154
6.4.	Conclusió	157
7.	CONCLUSIONS	159
8.	BIBLIOGRAFIA	163
9.	ANNEX. CONTRIBUCIONS ADDICIONALS	193
9.1.	Article 1: "Vestibular toxicity of cis-2-pentenenitrile in the rat"	195
9.2.	Article 2: "Vestibulotoxic properties of potential metabolites of allylnitrile"	203
9.3.	Article 3: "Reduced systemic toxicity and preserved vestibular toxicity following co-treatment with nitriles and CYP2E1 inhibitors: a mouse model for hair cell loss"	215
9.4.	Article 4: "Vestibular damage in chronic ototoxicity"	227

1. ABREVIATURES

AMPA: receptor àcid α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic.

Caspr1: contactin-associated protein 1.

CC: cèl·lula ciliada.

CtBP2: C-terminal-binding protein 2.

DDSA: medi epoxi d'incrustació, enduridor.

DMP-30: medi epoxi d'incrustació, accelerador.

DRAQ5: marcador fluorescent del DNA.

EAAT1: excitatory amino acid transporter 1.

EI: espai intercel·lular.

ELA: esclerosi lateral amiotròfica.

EPON: medi epoxi d'incrustació.

IDPN: 3,3'-iminodipropionitril.

i.p.: intraperitoneal.

KCNQ4: canal de potassi depenent de voltatge, subfamília KQT, membre 4.

MAGUK: guanilat cinasa associada a membrana.

MOWIOL: polyvinyl alcohol 4-88.

N: terminal nerviosa.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleòtid.

NaV1.5, 1.8 i 1.9: canals de sodi operats per voltatge.

NDMA: receptor N-metil-D-aspartato.

NF: neurofilament.

NFH: subunitat del neurofilament de pes molecular alt.

NFL: subunitat del neurofilament de pes molecular baix.

NFM: subunitat del neurofilament de pes molecular mig.

NMA: medi epoxi d'incrustació, enduridor.

ON: over night (tota la nit).

PBS: phosphate buffered saline (tampó fosfat salí).

PSD-95: postsynaptic density-95.

SE: desviació estàndard.

SEM: microscòpia electrònica de rastreig.

SNC: sistema nerviós central.

TA: temperatura ambient.

TEM: microscòpia electrònica de transmissió.

VDR: Vestibular Disfunction Rating (puntuació de disfunció vestibular).

US: Unió Septada.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. El Sistema Vestibular: Generalitats

El sistema vestibular (sentit de l'equilibri) i el sistema auditiu (sentit de l'oïda) són dos sistemes sensorials que comparteixen similituds mecàniques i estructurals.

L'equilibri depèn d'una organització sensorial complexa que implica la comunicació entre l'aparell vestibular, el sistema ocular, els músculs posturals, el tronc cerebral, el cerebel i el còrtex (Khan & Chang, 2013). El sistema vestibular registra la posició i el moviment del cap, proporciona el sentit de l'equilibri i ajuda a coordinar els moviments del cap i dels ulls, així com a ajustar la postura del cos. Quan el sistema vestibular funciona amb normalitat, no s'acostuma a ser conscient de la seva presència. No obstant, quan la seva funció s'altera els resultats són sensacions desagradables i de marejos que habitualment s'associen a la cinetosi: vertigen i nàusees, juntament a una sensació de pèrdua d'equilibri i moviments oculars incontrolables.

Les funcions del sistema vestibular són: 1) informar al sistema nerviós central sobre qualsevol acceleració o desacceleració angular o lineal; 2) ajudar a l'orientació visual, mitjançant el control dels músculs oculars; i 3) controlar el to dels músculs esquelètics per tal de mantenir una postura adequada.

2.1.1. Anatomia

L'orella dels mamífers està integrada per tres parts (Fig. 11): orella externa, orella mitjana i orella interna.

L'orella interna és comú a tots els vertebrats, i en el cas dels mamífers es troba situada dins de l'os temporal del crani. Està formada per la còclea (sistema auditiu) i pel laberint vestibular (sistema vestibular).



Figura 11. Esquema de les diferents parts de l'orella dels mamífers. Imatge adaptada de www.xtec.cat.

2.1.1.1. Còclea

La còclea també s'anomena caragol per la seva forma, al seu interior es troba l'òrgan de Corti, que conté les cèl·lules ciliades (Fig. 12) que responen a les vibracions transmeses pel líquid de la còclea. És l'òrgan receptor de l'audició.

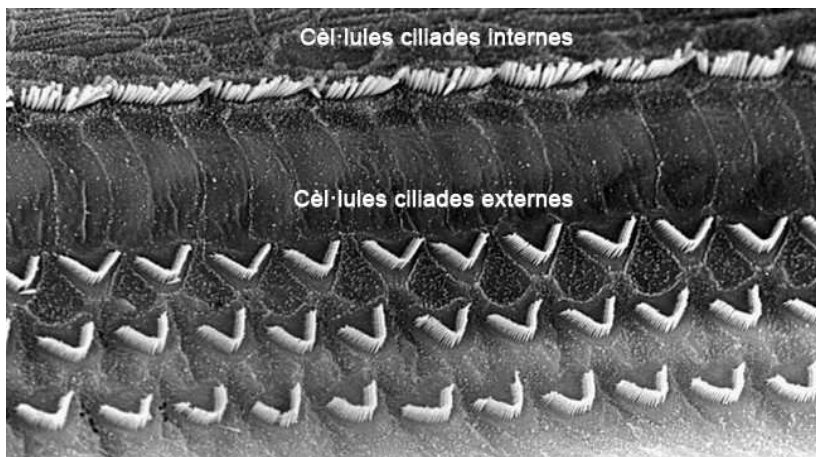


Figura 12. Microscòpia electrònica de rastreig de la còclea de la rata. S'observen les tres fileres de cèl·lules ciliades externes i la filera de cèl·lules ciliades internes. S'identifiquen clarament els estereocilis de les cèl·lules ciliades. Imatge adaptada de Crofton et al., 1994.

2.1.1.2. Laberint Vestibular

El laberint vestibular (Fig. I3) conté dues estructures amb funcions diferents: els conductes semicirculars, que són sensibles a la rotació del cap, i els òrgans otolítics, que detecten la força de la gravetat i les inclinacions del cap. En total, hi ha cinc epitelis sensorials vestibulars a cada orella: tres crestes, un utricle i un sàcul.

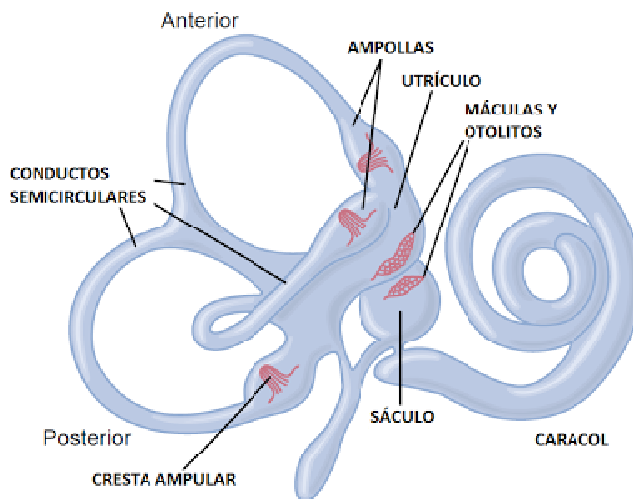


Figura I3. Esquema de la distribució del laberint vestibular. S'aprecia la localització dels conductes semicirculars amb les crestes ampul·lars i els òrgans otolítics (utricle i sàcul), entre altres. Imatge adaptada de *Fisiología Médica, Guyton & Hall*.

2.1.2. Epitelis Vestibulars

2.1.2.1. Conductes Semicirculars

Els conductes semicirculars (Fig. I3) estan disposats en angle recte un respecte l'altre, en tres plans: els dos de posició vertical són els conductes semicirculars superior i posterior, i el tercer és el conducte semicircular horitzontal o lateral. La porció dilatada de cada un d'ells és l'ampul·la del conducte semicircular. A l'interior de l'ampul·la hi ha una petita protuberància anomenada *cresta* (Fig. I4.A), que conté cèl·lules ciliades i

de suport cobertes per una petita massa de material gelatinós, la cúpula (Fig. I4.B). Les cèl·lules ciliades, descrites en detall més endavant, es caracteritzen pel conjunt d'estereocilis apicals, i un únic cinocili, disposats ordenadament en una orientació precisa.

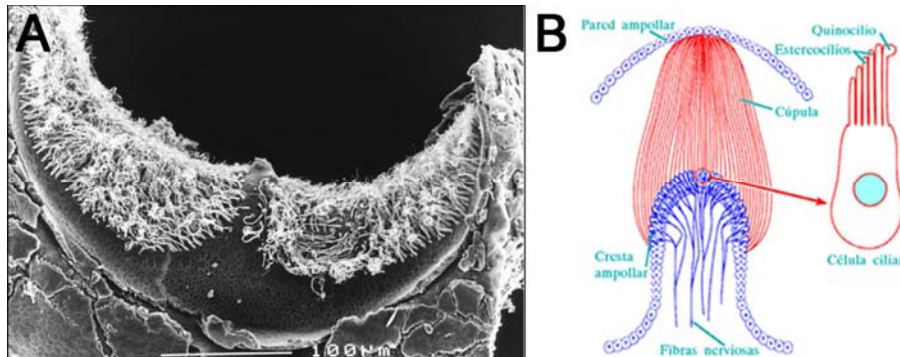


Figura 14. *A. Microscòpia electrònica de rastreig de la cresta de la rata. Imatge adaptada de Llorens, Demêmes & Sans, 1993. B. Esquema de la distribució de la cúpula i les cèl·lules ciliades al llarg de la cresta. Imatge adaptada de Basic Physiology for the Health Science, Selkurt.*

La funció dels conductes semicirculars és detectar l'acceleració o desacceleració rotacional. Els conductes semicirculars estan plens d'*endolimfa*, la qual degut al moviment rotacional exerceix una força sobre la cúpula, que provoca la inclinació dels cilis en direcció oposada a la rotació, i com a resultat té lloc l'obertura dels canals iònics causant la despolarització de la cèl·lula ciliada. Quan la velocitat rotacional del cap esdevé constant, la cúpula torna a la posició vertical i el potencial de membrana de la cèl·lula es normalitza. Quan s'atura la rotació la inèrcia de l'endolimfa fa que la cúpula es corbi en la direcció oposada (Khan & Chang, 2013), és a dir, que es desplaça en la mateixa direcció que el moviment del cap, el que genera una resposta contrària de les cèl·lules ciliades i una sensació temporal de contra rotació que causa la hiperpolarització de la cèl·lula. Els cinocilis de les cèl·lules ciliades del conducte lateral estan orientats cap a l'utricle, i els cinocilis dels conductes superior i posterior estan orientats cap al conducte (Khan & Chang, 2013).

2.1.2.2. Òrgans Otolítics

Els òrgans otolítics són l'*utricle* (Fig. 15.A) i el *sàcul* (Fig. 15.B). Cada òrgan otolític conté un epitelí sensorial anomenat *màcula* (Fig. 16), que està orientat verticalment al *sàcul* i horitzontalment a l'*utricle* quan el cap està en posició vertical. La *màcula vestibular* conté cèl·lules ciliades, que es disposen sobre un llit de cèl·lules de suport i els seus cilis es projecten cap a l'interior d'una coberta gelatinosa. Les cèl·lules ciliades de la *màcula* transdueixen els moviments quan es dobleguen els feixos de cilis.

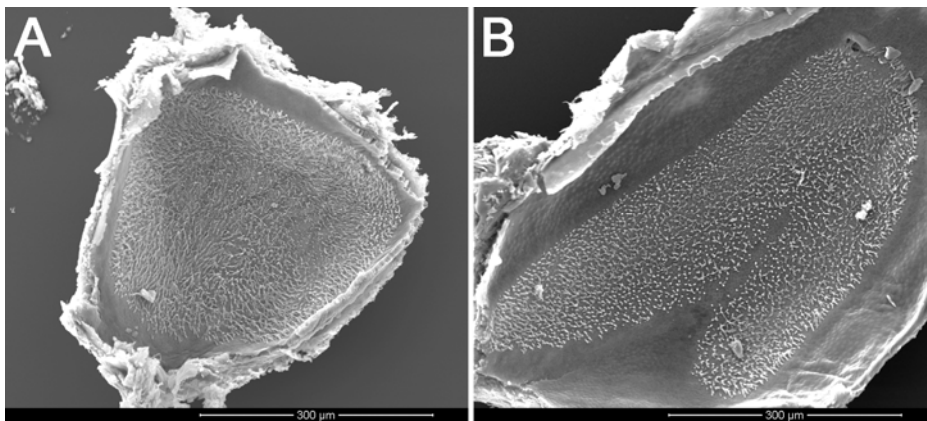


Figura 15. Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans otolítics de la rata. **A.** Utricle. **B.** Sàcul. Imatges pròpies.

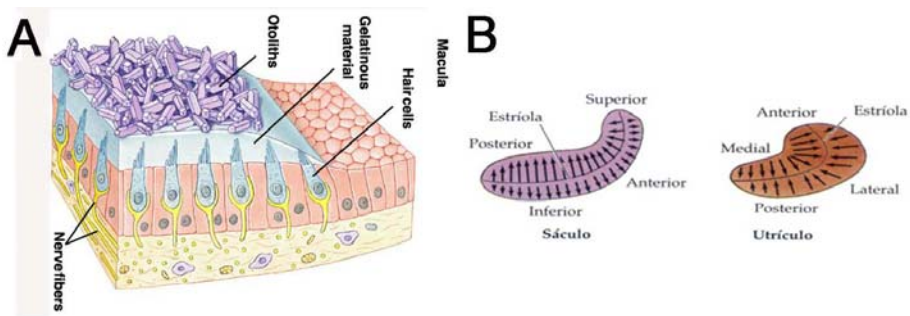


Figura 16. Màcula. **A.** Epitelí sensorial amb cèl·lules ciliades i cèl·lules de suport, recobert per material gelatinós i al damunt la presència d'otocònies. **B.** Les fletxes indiquen l'orientació de les cèl·lules ciliades, que s'inverteix a l'estriola. Imatges adaptades de *Principios de Anatomía y Fisiología*, Tórtora & Grabowski.

La característica distintiva dels òrgans otolítics són els diminuts cristalls de carbonat càlcic anomenats otocònies, d'1-5 μ m de diàmetre (el terme prové del grec i significa “pedra de l'oïda”). Les otocònies (Fig. I7.A) estan incrustades a la superfície del recobriment gelatinós de la màcula. Les cèl·lules ciliades són cèl·lules polaritzades que es disposen de manera ordenada als òrgans otolítics (Fig. I7.B). La disposició de les cèl·lules canvia 180° al centre de les màcules, a banda i banda d'una línia imaginària anomenada estriola (Fig. I6.B). L'estriola té una trajectòria corba al centre de les màcules i és una àrea d'aprimament a l'utricle i una àrea d'engruiximent al sàcul (Oghalai & Brownell, 2012). El cinocili i els estereocilis de les cèl·lules ciliades estan orientats cap a l'estriola a l'utricle i lluny de l'estriola al sàcul (Fig. I6.B). Aquesta distribució de les cèl·lules ciliades en direccions diferents indica que hi ha diversos patrons d'excitació de les cèl·lules ciliades depenent del grau d'inclinació del cap (Khan & Chang, 2013). El moviment pot estimular un grup de cèl·lules ciliades mentre que inhibeix un altre grup i no té efecte en un altre grup de cèl·lules ciliades.

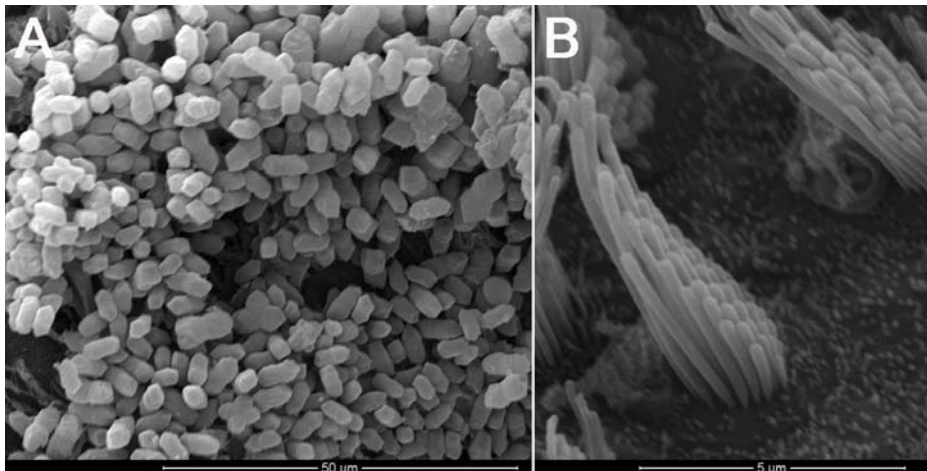


Figura I7. Microscòpia electrònica de rastreig de l'utricle de la rata. **A.** Otocònies. **B.** Cèl·lula ciliada. Imatges pròpies.

La funció dels òrgans otolítics és captar l'acceleració lineal del cap i respondre a les forces gravitacionals. Quan s'inclina el cap s'exerceix una força sobre les otocònies,

les quals exerceixen al mateix temps una força en la mateixa direcció sobre la coberta gelatinosa, fet que provoca que els cilis de les cèl·lules ciliades es dobleguin.

2.2. Les Cèl·lules Ciliades i la seva Innervació

2.2.1. Característiques de les Cèl·lules Ciliades

Tots els epitelis vestibulars contenen dos tipus morfològics diferents de cèl·lules ciliades, conegudes com cèl·lules ciliades de tipus I i cèl·lules ciliades de tipus II (Fig. 18).

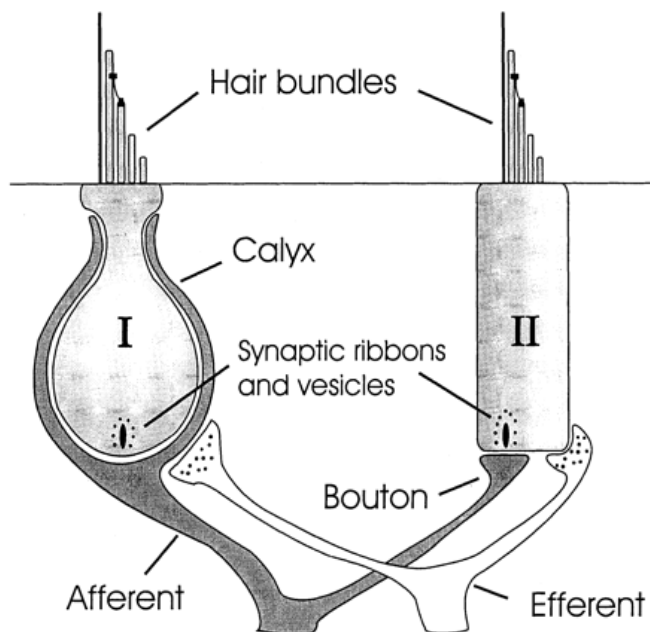


Figura 18. Representació esquemàtica dels dos tipus de cèl·lules ciliades vestibulars. Imatge adaptada de Chen & Eatock, 2000.

Les cèl·lules ciliades són les encarregades de transduir les ones sonores i les acceleracions del cap. El seu nom fa referència al feix de microvellositats apical, conegut com estereocilis, que conté la maquinària molecular per la transducció mecano-

elèctrica. Les cèl·lules ciliades vestibulars madures tenen un únic cili anomenat *cinocili* (Fig. I9), mentre que les cèl·lules ciliades auditives perden el cinocili durant la seva maduració, i aproximadament tenen 70-100 estereocilis en el seu extrem apical (Khan & Chang, 2013). Els estereocilis estan organitzats en files del més alt, que és el més pròxim al cinocili, fins al més baix, que és el més allunyat del cinocili. Les unions en punta (*tip links* en anglès) connecten la punta de l'estereocili més baix amb el cos de l'estereocili adjacent que és més alt. Quan el moviment del cap dóna lloc a la inclinació dels estereocilis cap al cinocili (Khan & Chang, 2013) (Fig. I9), el desplaçament de les unions en punta provoca l'obertura mecànica dels canals de transducció, que es troben situats a la punta dels estereocilis, donant lloc a un flux de potassi que despolaritza la cèl·lula (Fig. I10) i obre els canals de calci situats a la base dels dos tipus de cèl·lules ciliades; el flux de calci estimula l'alliberament de neurotransmissors entre les cèl·lules ciliades, que són presinàptiques, i les fibres nervioses aferents de les neurones ganglionars vestibulars. La flexió dels estereocilis cap al costat oposat al cinocili disminueix la tensió de la unió en punta i dóna lloc a un tancament mecànic del canal, el que causa la hiperpolarització de la cèl·lula ciliada (Fig. I10), que tanca els canals de calci i disminueix l'alliberament de neurotransmissors.

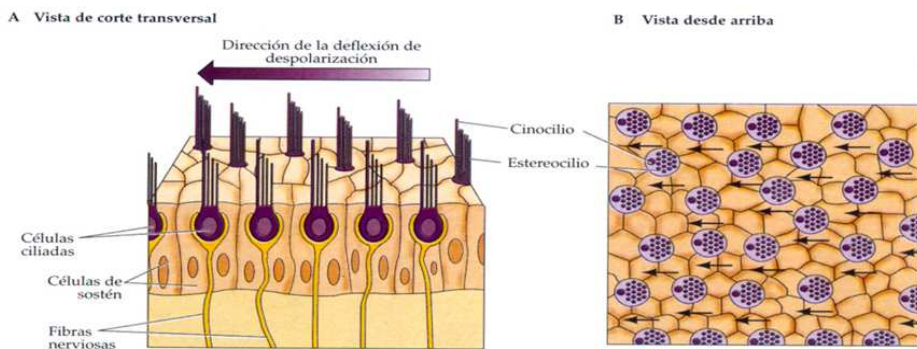


Figura I9. Organització dels estereocilis i despolarització de les cèl·lules ciliades. Imatges adaptades de *Principios de Anatomía y Fisiología*, Tórtora & Grabowski.

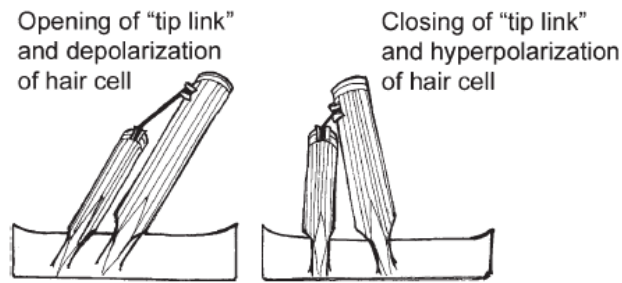


Figura I10. Representació esquemàtica de la despolarització i hiperpolarització de les cèl·lules ciliades. Imatge adaptada de Khan & Chang, 2013.

2.2.2. Tipus de Cèl·lules Ciliades

Els vertebrats anamniotes, és a dir, els peixos i els amfibis només tenen un tipus de cèl·lules ciliades, les de tipus II que estan innervades per sinapsis aferents en botó (Lysakowski, 1996). Des d'un punt de vista filogenètic, les cèl·lules ciliades de tipus I no apareixen fins més tard a l'evolució i només es troben en vertebrats superiors. Les cèl·lules ciliades de tipus I són morfològicament diferents de les de tipus II (Fig. I8): tenen un cos cel·lular que s'estreny a l'apex (Ricci *et al.*, 1997) i que recorda la forma d'una àmfora (Fig. I11). A més a més, les cèl·lules ciliades de tipus I es diferencien de les de tipus II gràcies a les sinapsis en forma de calze, que es formen amb les terminacions nervioses de les neurones vestibulars primàries i que envolten tota la zona basolateral de la cèl·lula. Aquest tipus de sinapsis de les cèl·lules ciliades de tipus I és únic en el sistema nerviós (Bonsacquet *et al.*, 2006; Dalet *et al.*, 2012). Les aferents poden formar terminals només de tipus calze sol (*calyx-only afferent* en anglès) o formar terminals d'ambdós tipus, calze i botons, que són conegudes com dimòrfiques (*dimorphic afferent* en anglès) (Fig. I13). Les cèl·lules ciliades es troben rodejades de cèl·lules de suport (Fig. I12). Els diferents tipus de cèl·lules ciliades i aferents es disposen de manera desigual al llarg de l'epiteli vestibular. Les cèl·lules ciliades de tipus II són més abundants a la zona extraestriolar, és a dir, a la zona més perifèrica de l'epiteli. Mentre que les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol es troben exclusivament a la zona estriolar, és a dir, més al centre de l'epiteli. En la zona

periestriolar són més abundants les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents dimòrfiques.

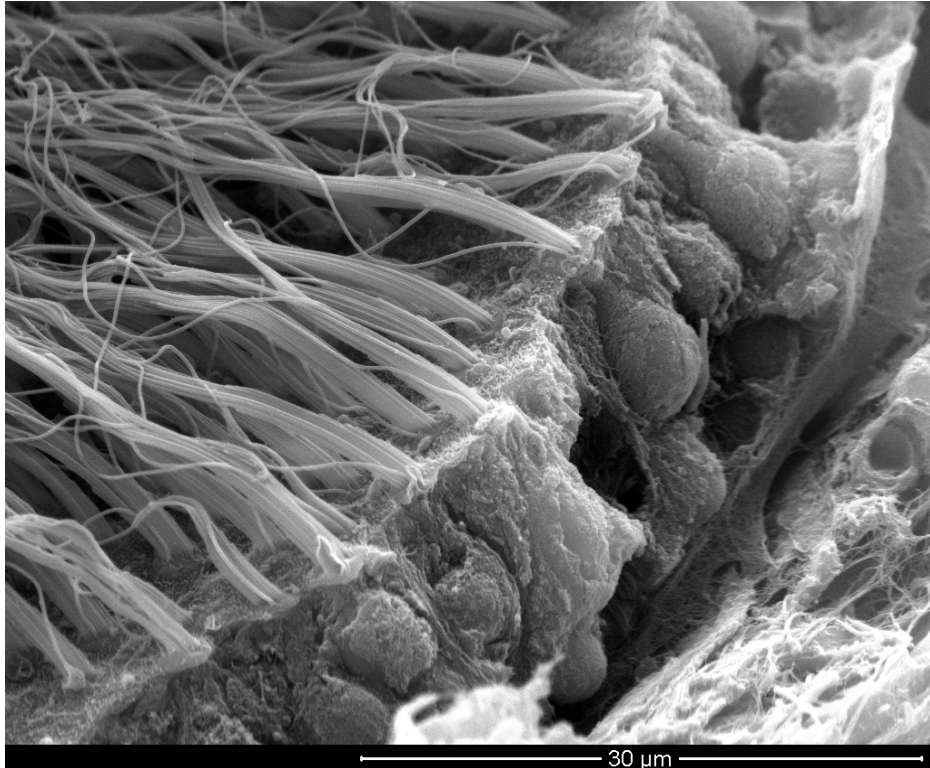


Figura III. *Microscòpia electrònica de rastreig d'una secció de la cresta de la rata on s'observa la morfologia de les cèl·lules ciliades. Imatge pròpia.*

La zona apical de la cèl·lula és on es troben els cilis i està rodejada d'endolimfa (Fig. II3), que és un líquid on el catió predominant és el potassi, mentre que el contingut de sodi és extremadament baix. L'elevat contingut de potassi requereix de mecanismes actius de transport iònic per al seu manteniment. Mentre que la zona distal de les cèl·lules ciliades es troba envoltada per perilimfa, que és un filtrat del líquid cefaloraquidi, amb una composició iònica típica dels líquids extracel·lulars (en la qual predomina el sodi). Aquesta composició no és constant, ja que s'aprecien petites variacions segons la localització.

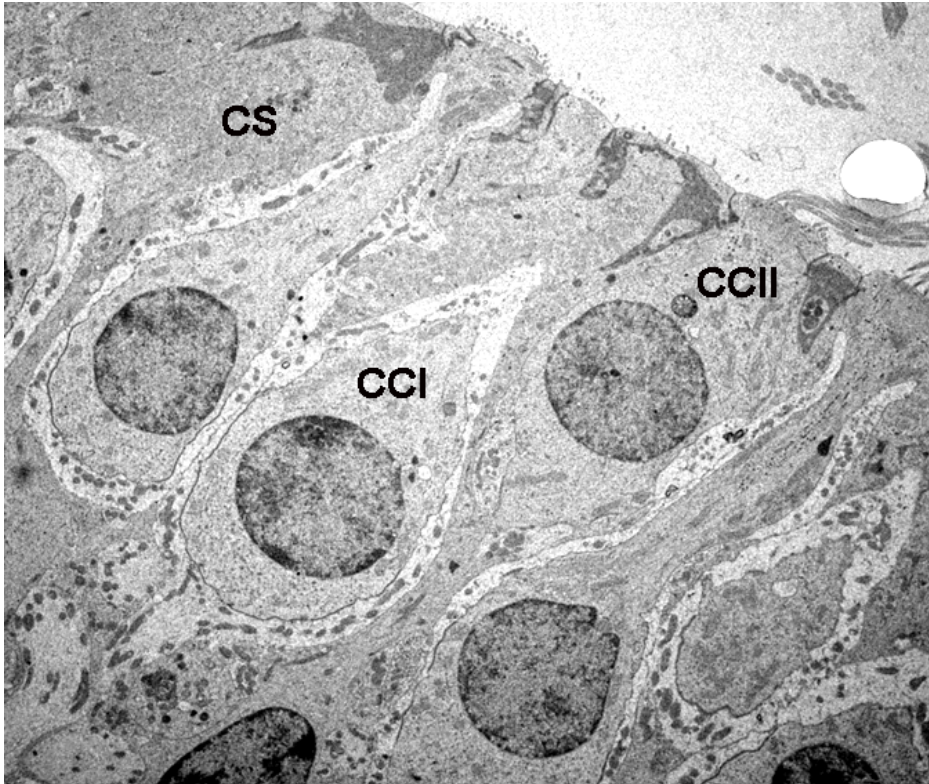


Figura II2. Microscòpia electrònica de transmissió de la cresta de la rata on s'observen les cèl·lules de suport (CS) i els dos tipus de cèl·lules ciliades: cèl·lules ciliades de tipus I (CCI) i cèl·lules ciliades de tipus II (CCII). Imatge adaptada de Seoane et al., 2001b.

2.2.3. El Sistema Eferent

Els òrgans vestibulars de tots els vertebrats estan innervats per les projeccions eferents que provenen del tron encefàlic (Gacek, 1982; Schwartz & Ryan, 1986). Les terminacions eferents formen contactes sinàptics amb les cèl·lules ciliades de tipus II però també amb les terminals aferents en calze i en botó (Fig. I13) (Hilding & Wersall, 1962; Smith & Sjostrand, 1968; Iurato *et al.*, 1972) de les cèl·lules ciliades de tipus I.

El sistema eferent permet el control de la informació vestibular i per consegüent el manteniment de l'equilibri postural. Aquestes respostes eferents passen per diferents vies: les vies vestibulo-espinal, reticulo-espinal i tecto-espinal.

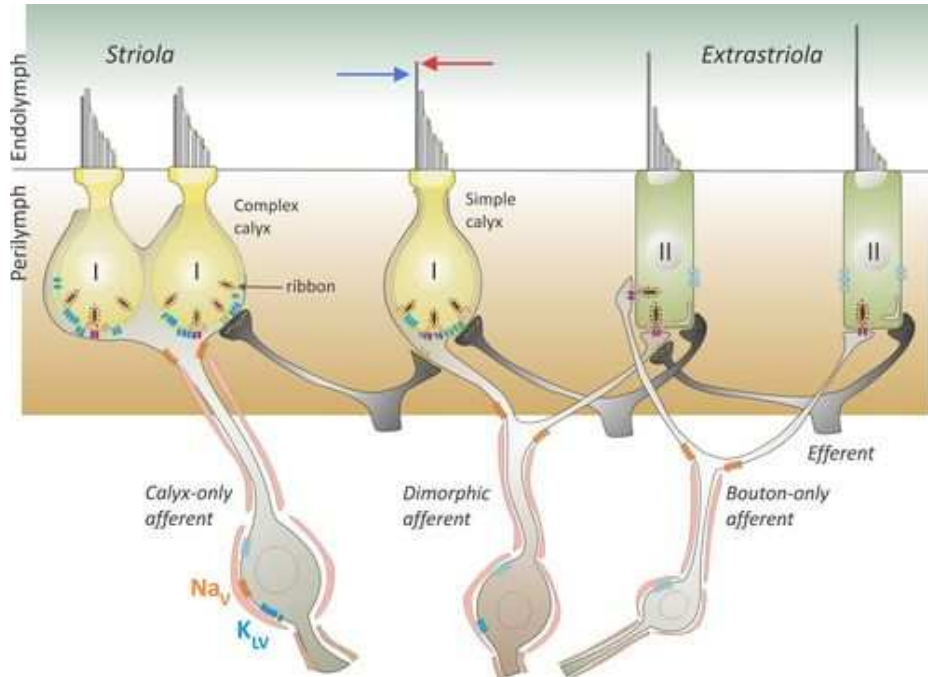


Figura 113. Esquema de l'epiteli vestibular, mostrant les zones estriolar i extraestriolar, i la distribució preferent dels dos tipus de cèl·lules ciliades al llarg de l'epiteli dels diferents tipus de sinapsis eferents i aferents, i de la distribució de l'endolimfa i la perilimfa. Imatge adaptada de R.A. Eatock Laboratory Webpage.

2.2.4. El Sistema Aferent

A nivell dels epitelis vestibulars es poden observar dos tipus de sinapsis aferents: les sinapsis en botó, que fan contacte amb les cèl·lules ciliades de tipus II, i les sinapsis en calze, que fan contacte amb les cèl·lules ciliades de tipus I; aquestes últimes envolten tota la zona basolateral de la cèl·lula suggerint una transmissió sinàptica molt més complexa que la que s'efectua a nivell de les terminals en botó.

Les cèl·lules ciliades vestibulars són presinàptiques a les terminals aferents de les neurones ganglionars vestibulars, i la despolarització condueix a l'alliberament de neurotransmissors a la membrana basolateral de la cèl·lula (Fig. 114). El neurotransmissor és glutamat i això fa de la terminal aferent postsinàptica un candidat

pel dany excitotòxic. Les sinapsis en botó de les cèl·lules ciliades de tipus II estan envoltades per cèl·lules de suport que expressen EAAT1 (excitatory amino acid transporter 1) per a la recaptació de glutamat (Takumi *et al.*, 1997).

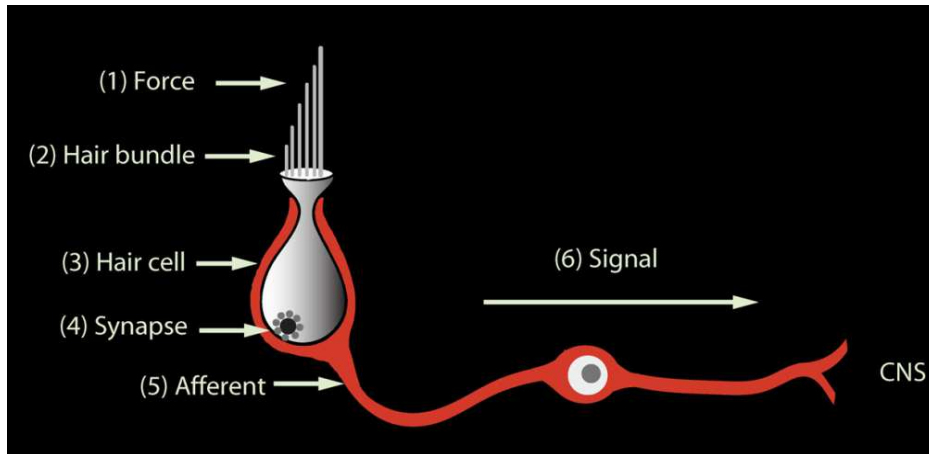


Figura I14. Direcció de la senyal en els contactes sinàptics aferents. Imatge adaptada de Ohio University Laboratory of Vestibular Neuroethology.

Les neurones vestibulars primàries que fan sinapsi amb les cèl·lules ciliades es troben al gangli d'Escarpa, que es troba a nivell de l'os temporal, pròxim als epitelis sensorials.

2.2.5. Unions Septades

Els contactes entre les membranes de les cèl·lules ciliades de tipus I i les neurones del calze per mitjà de l'ultraestructura es mostren com dues membranes electrodenses separades per un espai molt regular (Fig. I15).

A la membrana del calze hi ha una unió intercel·lular, rara en vertebrats, anomena unió septada (*septate junction* en anglès), que proporciona suport estructural al contacte sinàptic aferent del calze amb les cèl·lules ciliades vestibulars de tipus I. El nucli d'aquesta unió és el dímer de Caspr1 i Contactina. Les unions septades són

comuns en invertebrats on formen barreres de permeabilitat selectiva i també segreguen dominis de membrana (Laval *et al.*, 2008), i són reemplaçades per les unions estretes (*tight junctions* en anglès) en els vertebrats. En els vertebrats les unions septades més ben descrites són les formades entre els axons i les cèl·lules mielinitzades a les regions paranodals (Fig. I17).

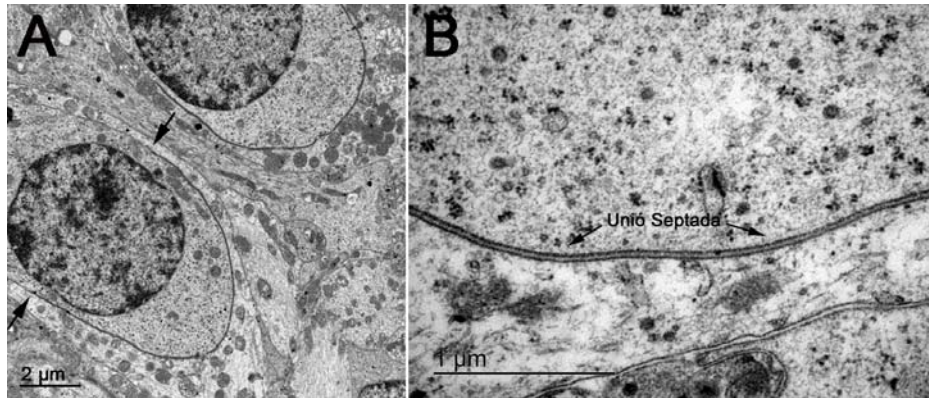


Figura I15. Microscòpia electrònica de transmissió de la unió septada de la rata. **A.** Vista general d'una cèl·lula ciliada de tipus I on s'aprecia la localització basolateral de la unió septada. Les fletxes negres delimiten l'inici i el final de la unió septada. **B.** Ampliació unió septada. Imatges pròpies.

Les unions septades juguen un paper important en la formació i manteniment del gradient de càrregues, en la mida selectiva de les barreres (Faivre-Sarrailh *et al.*, 2004), així com produeixen un suport estructural al contacte sinàptic del calze amb les cèl·lules ciliades de tipus I.

La zona de la unió septada representa un microdomini funcional, caracteritzat per la col·localització de nombroses proteïnes d'adhesió cel·lular, de matriu extracel·lular i de canals iònics, que formen microdominis amb la membrana del calze (Lysakowski *et al.*, 2011). Caspr1 és requerida pel reclutament i retenció de KCNQ4 (canal de potassi depenent de voltatge) (Fig. I16) i altres proteïnes que produeixen el característic perfil electrodens d'aquesta membrana (Sousa *et al.*, 2009; Lysakowski *et al.*, 2011).

2.2.6. Proteïnes del Contacte Aferent

2.2.6.1. KCNQ4

KCNQ4 és un canal de potassi depenent de voltatge que juga un paper clau en la regulació de l'excitabilitat neuronal, particularment a les cèl·lules sensorials. Treballs previs realitzats en epitelis immadurs de rata (Hurley *et al.*, 2006) mostraven immunoreactivitat de KCNQ4 a la cara interna del calze, oposada a les cintes sinàptiques (*ribbons* en anglès) de les cèl·lules ciliades. KCNQ4 és present en una elevada densitat a les cares internes del calze en la zona de la unió septada i en una densitat molt més baixa a les cares externes (Hurley *et al.*, 2006). KCNQ4 s'expressa en tots els calzes, però el marcatge és més intens als calzes centrals (Lysakowski *et al.*, 2011) que als calzes perifèrics. A les crestes, KCNQ4 es troba a les zones central, intermèdia i perifèrica, en canvi, en els utricles es troba més expressat a la zona central de l'estriola i a les regions adjacents juxtaestriolars (Spitzmaul *et al.*, 2013).

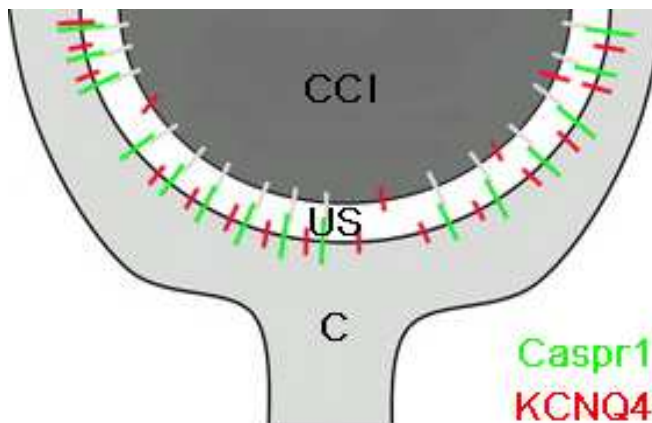


Figura II6. Distribució de Caspr1 i KCNQ4 a les unions septades del calze de les cèl·lules ciliades de tipus I. CCI Cèl·lula ciliada de tipus I. US Unió Septada. C Calze. Imatge adaptada de Sousa *et al.*, 2009.

Es va comprovar que la localització de les subunitats de KCNQ4 a la cara interna del calze (Sousa *et al.*, 2009) requeria de la proteïna d'adhesió cel·lular Caspr1.

KCNQ4 col·localitza amb Caspr1 a la membrana postsinàptica de les sinapsis en calze (Sousa *et al.*, 2009; Lysakowski *et al.*, 2011) i es redistribueix i apareix dispers al llarg de tota la membrana aferent en ratolins nuls per Caspr1 (Sousa *et al.*, 2009). Es creu que KCNQ4 contribueix a l'homeòstasi del potassi a les sinapsis en calze (Sousa *et al.*, 2009).

2.2.6.2. Caspr1

Caspr1 (contactin-associated protein 1) és una proteïna d'adhesió cel·lular (Sousa *et al.*, 2009) relacionada amb Contactina (Lysakowski *et al.*, 2011), que està molt expressada al calze vestibular. Es va identificar com un component clau de les unions septades dels mamífers, incloent aquelles situades a les regions paranodals dels axons mielinitzats (Fig. I17) i aquelles situades entre les cèl·lules ciliades de tipus I i les aferències (Sousa *et al.*, 2009; Lysakowski *et al.*, 2011). El paper de Caspr1 en el contacte del calze rau en la formació de les unions septades, ja que defineix l'estret espai entre les membranes oposades, i al mateix temps proveeix d'una barrera de difusió. Anàlisis ultraestructurals i d'immunofluorescència realitzats en ratolins knock-out per Caspr1 revelen que la separació entre la membrana de les cèl·lules ciliades i les neurones aferents és notablement irregular i sovint s'incrementa en un ordre de magnitud.

A les unions paranodals (Fig. I17), Caspr1 connecta per mitjà de la proteïna 4.1B amb els components del citoesquelet dins de l'axó (Gollan *et al.*, 2002), així com amb molècules com l'ankyrina B, l' α II espectrina i la β II espectrina (Ogawa *et al.*, 2006). La interacció de Caspr1 amb 4.1B és necessària per la generació d'una eficient barrera de membrana a les unions paranodals (Horresh *et al.*, 2010). L'associació de Caspr1 amb les proteïnes postsinàptiques del citoesquelet permet modular la interacció dels receptors AMPA (Menegoz *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 2000; Coleman *et al.*, 2003) amb components especialitzats del citoesquelet a les bastides postsinàptiques. Caspr1 pot constituir un nou membre de la llista creixent de les proteïnes auxiliars al receptor AMPA (Santos *et al.*, 2011).

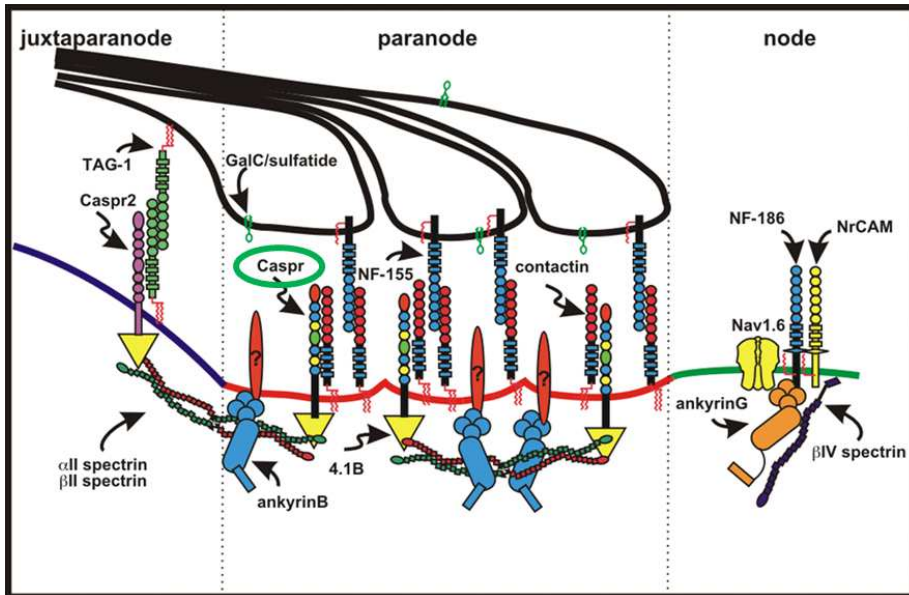


Figura I17. Localització de Caspr1 a les regions paranodals. Imatge adaptada d'Ogawa et al., 2006.

L'organització de les unions septades dels vertebrats (Faivre-Sarrailh et al., 2004) depèn de les interaccions entre les següents molècules d'adhesió cel·lular Caspr, Contactina i Neurofascina-155 (Fig. I18). No obstant, la parella de Caspr/Contactina a les cèl·lules ciliades de tipus I no està identificat encara.

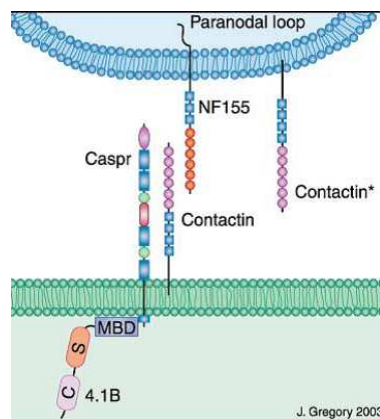


Figura I18. Localització de les molècules d'adhesió cel·lular presents a les unions septades. Imatge adaptada de Salzer, 2003.

2.2.6.3. Contactina-1

La Contactina-1 és una molècula d'adhesió cel·lular de la família de les immunoglobulines que forma heterodímers amb Caspr1, a les unions septades. La Contactina-1 pot regular la densitat de corrent i l'expressió dels canals NaV1.5, com es creu que fa amb les subunitats NaV1.8 i NaV1.9 (Rush *et al.*, 2005). Es va observar que el marcatge de Contactina-1 era comparable al de Caspr1 als epitelis vestibulars (Lysakowski *et al.*, 2011).

2.2.6.4. Tenascina-C

La Tenascina-C és una gran glicoproteïna de matriu extracel·lular que es troba associada a les cèl·lules ciliades de tipus I (Warchol & Speck, 2007) i adjacent a la membrana que conté Caspr1, és a dir, a la zona de la unió septada (Swartz & Santi, 1999; Lysakowski *et al.*, 2011). És una proteïna homohexamèrica que es sap que interactua amb la Contactina (Falk *et al.*, 2002). En humans està codificada pel gen TNC.

La Tenascina-C contribueix a la formació del material electrodens de les fosses sinàptiques del segment de contacte entre la terminal aferent i la cèl·lula ciliada que està definit per les unions septades (Lysakowski *et al.*, 2011).

2.2.6.5. Neurofilament (NF)

Els neurofilaments són els filaments intermedis propis de les neurones. Estan formats per cinc tipus de proteïnes: tres proteïnes van ser identificades inicialment i s'anomenen subunitats dels neurofilaments de pes molecular baix (NFL), mig (NFM) i alt (NFH); les altres dues són l' α -internexina i la periferina, que van ser identificades posteriorment (Yuan *et al.*, 2009). Cada una d'aquestes proteïnes s'expressa en moments determinats de la diferenciació i el desenvolupament, i en els animals adults

s'expressen segons el tipus de neurones —les subunitats dels neurofilaments són típiques de les neurones d'axons llargs, mentre que les altres dues proteïnes abunden en neurones d'axons curts i es sobreexpressen en cas de dany—. Les proteïnes que formen els neurofilaments estan coensamblades entre elles formant diferents combinacions; els neurofilaments heteropolimèrics són els més abundants del citoesquelet i es troben en neurones grans amb axons mielinitzats, particularment neurones motores i sensorials (Lee & Cleveland, 1996).

Els neurofilaments són els responsables del manteniment del diàmetre axonal i, per tant, de les propietats elèctriques de l'axó que determinen la velocitat de conducció (Fliegher & Liem, 1991; Lee & Cleveland, 1996; Leung *et al.*, 1998; Julien & Mushynski, 1998; Yan *et al.*, 2007).

2.2.7. Proteïnes de la Neurotransmissió

Les cintes sinàptiques (*ribbons* en anglès) (Fig. I19) són cossos densos als electrons, esfèriques o el·lipsoidals i estan rodejades de nombroses vesícules associades (Lieberman *et al.*, 1990). Estan desplegadas prop de la membrana basolateral de la cèl·lula, a la part basal d'aquesta i arriben fins part dels costats (Lysakowski *et al.*, 2011). El nombre i extensió de les cintes és més gran a les cèl·lules ciliades de tipus I centrals que a les perifèriques (Lysakowski & Goldberg, 1997).

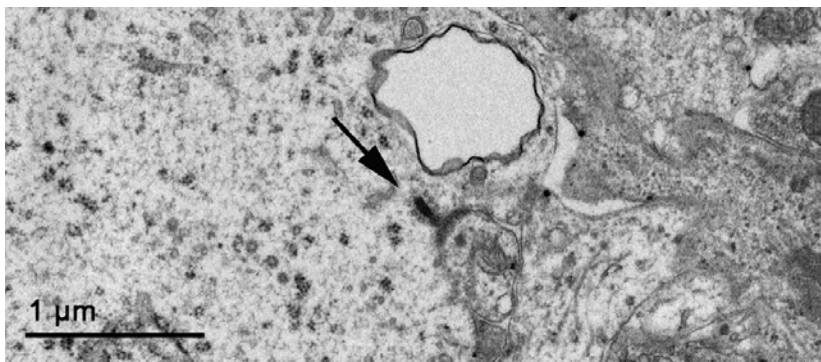


Figura I19. Microscòpia electrònica de transmissió d'una sinapsi en cinta en una cèl·lula ciliada de tipus II de la rata, senyalada per una fletxa negra. Imatge pròpia.

Les sinapsis clàssiques en cinta només es troben en vertebrats, on estan ben caracteritzades a les sinapsis sensorials amb requeriments de senyalització extraordinària. A la retina, els fotoreceptors i les cèl·lules bipolars contenen sinapsis en cinta (Dowling, 1987; Sterling, 1998); a més a més, les cèl·lules ciliades de la còclea i el vestíbul també tenen cintes sinàptiques (Smith & Sjöstrand, 1961; Hopsu & Arstila, 1964; Jastrow *et al.*, 1997; Lenzi *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000).

Des d'un punt de vista molecular (Fig. I20), les cintes estan formades per un gran nombre de proteïnes (Zanazzi & Matthews, 2009). L'única proteïna que es coneix que és específica de les cintes és Ribeye, la qual és el principal component estructural (Schmitz *et al.*, 2000; tom Dieck *et al.*, 2005). La detecció de Ribeye és una bona eina disponible en immunohistoquímica per estudiar les cintes sinàptiques. La proteïna Bassoon interactua amb Ribeye i permet a la cinta ancorar-se a la zona activa.

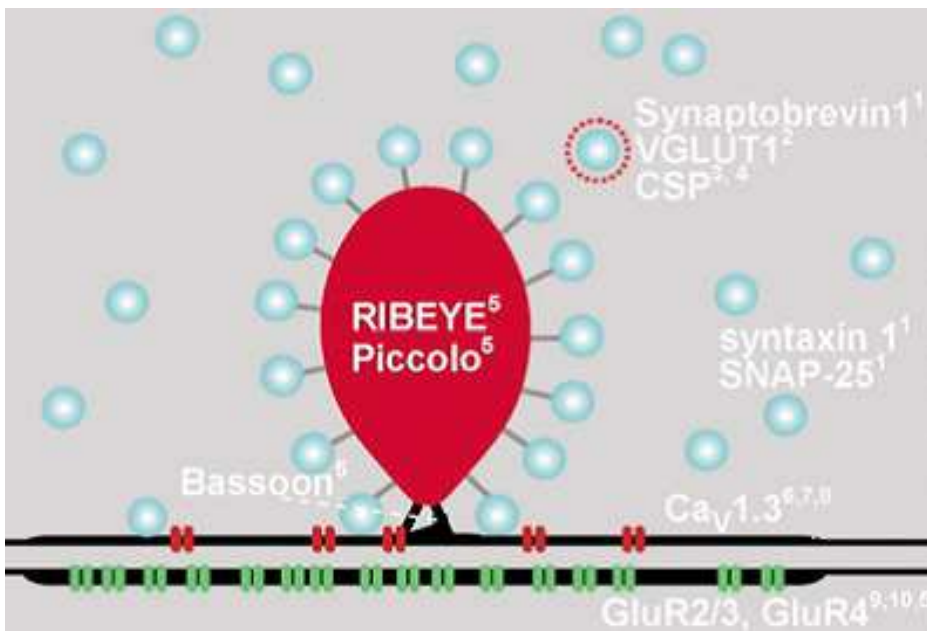


Figura I20. Composició molecular de les sinapsis en cinta. Imatge adaptada de Nouvian *et al.*, 2006.

Fisiològicament, les cintes sinàptiques estan caracteritzades per una alta taxa d'alliberament tònic de neurotransmissors mediada per una contínua exocitosi de vesícules sinàptiques (Dowling, 1987; Sterling, 1998). En general es creu que les sinapsis en cinta estan especialitzades en l'alliberament ràpid de les vesícules sinàptiques.

2.2.7.1. Ribeye

Ribeye/CtBP2 (C-terminal-binding protein 2) és una proteïna que en humans està codificada pel gen CTBP2. És un component presinàptic de les cintes.

Ribeye és el component majoritari de les sinapsis en cinta. Està format per dos dominis, el domini únic A que és específic per les cintes i el domini B identificat com CtBP2, un repressor transcripcional que a la vegada està relacionat amb la 2-hidroxiacídeshidrogenasa. El domini A intervé en el muntatge de la cinta en grans estructures, mentre que el domini B uneix NAD⁺ amb una gran afinitat (Schmitz *et al.*, 2000). Per mitjà del marcatge immunohistoquímic s'observen dues marques molt diferenciades; en el nucli de molts tipus cel·lulars com és el cas del nucli de les cèl·lules ciliades, i en els contactes sinàptics que contenen cintes a la retina i a l'orella interna.

2.2.7.2. PSD-95

La PSD-95 (postsynaptic density-95), com el seu nom indica, és una proteïna de la densitat postsinàptica. PSD-95 es va identificar per primera vegada per microscòpia electrònica com una regió electrodensa de la membrana de la neurona postsinàptica (Hunt *et al.*, 1996) i participa en l'ancoratge de les proteïnes sinàptiques. PSD-95 (Fig. I21) es troba en estreta aposició a la zona de sensibilitat presinàptica i assegura que els receptors estiguin en estreta proximitat als llocs d'alliberament dels neurotransmissors presinàptics. En humans està codificada pel gen DLG4 (Cho *et al.*, 1992; Stathakis *et*

al., 1997). És una proteïna membre de la família de guanilat cinasa associada a membrana (MAGUK).

Les seves parelles d'unió directes i indirectes són: neuroligina, receptors NMDA, receptors AMPA i canals de potassi (Sheng & Sala, 2001). Joga un paper important en la plasticitat sinàptica i l'estabilitat dels canvis sinàptics durant la potenciació a llarg termini.

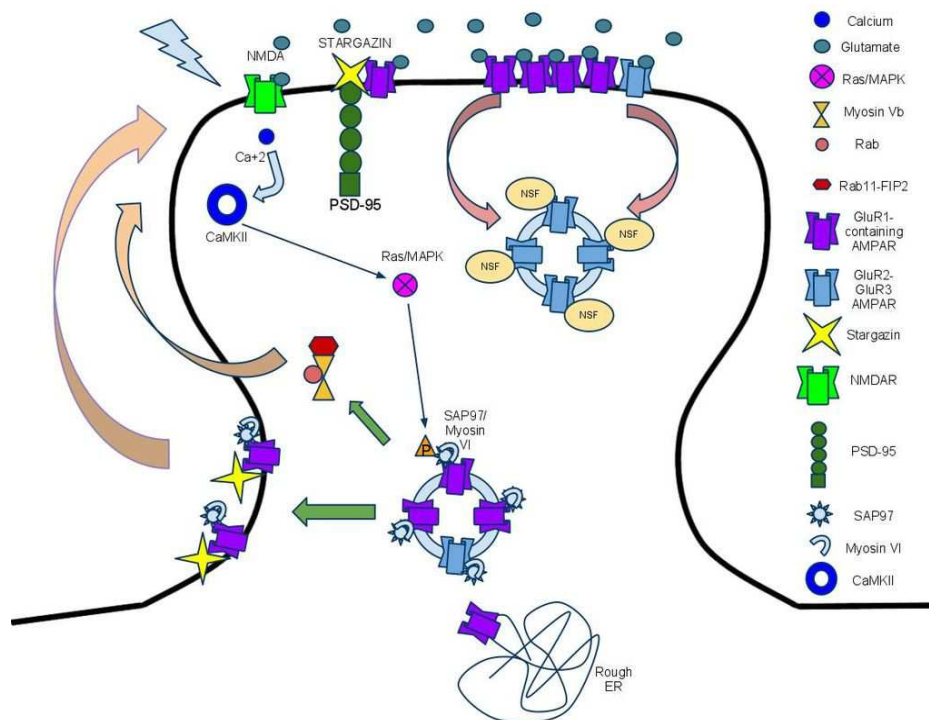


Figura 121. Esquema de la distribució dels components postsinàptics PSD-95 i GluR2. Font Park *et al.*, 2004.

PSD-95 pot estar associada amb la subunitat GluR2 del receptor AMPA a través de la proteïna transmembrana, Stargazina, controlant d'aquesta manera la inserció i la retenció d'aquests receptors a la membrana postsinàptica (Chen *et al.*, 2000; El-Husseini *et al.*, 2000; Schnell *et al.*, 2002; Dakoji *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2003; Fukata *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 2005; Bats *et al.*, 2007).

2.2.7.3. GluR2

GluR2 (Fig. I21) és una de les quatre subunitats del receptor de glutamat AMPA (receptor àcid α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic), el qual a més a més està format per les subunitats GluR1, GluR3 i GluR4 (o GluRA-D). AMPA és un receptor transmembrana per glutamat que es troba situat a la membrana postsinàptica i que intervé en la transmissió sinàptica excitatòria ràpida (Isaac *et al.*, 2007).

Totes les subunitats AMPA tenen una regió N-terminal extracel·lular, una regió C-terminal intracel·lular i quatre dominis hidrofòbics associats a la membrana (M1-4), un dels quals (M2) forma un bucle de reentrada. La gran majoria dels receptors AMPA del SNC existeixen com a heterodímers que contenen GluR2 (Wenthold *et al.*, 1996; Greger *et al.*, 2002). L'absència o presència de la subunitat GluR2 és determinant o no per la permeabilitat del receptor AMPA al calci (Migues *et al.*, 2007); si el receptor AMPA té manca de la subunitat GluR2 aleshores aquest serà permeable no només a sodi i potassi, sinó també a calci.

En el sistema vestibular, els receptors AMPA estan presents i funcionals. Un primer estudi de biologia molecular en rata (Niedzielski & Wenthold, 1995) va demostrar la presència d'ARN missatger de les unitats GluR2, 3 i 4 dels receptors AMPA i absència del GluR1 en els ganglis d'Scarpa, el qual va ser confirmat per microscòpia electrònica (Matsubara *et al.*, 1999). En efecte, els immunomarcatsges van mostrar la presència dels receptors AMPA tant a nivell de les sinapsis en botó de les cèl·lules ciliades de tipus II com a nivell de la cara interna dels calzes a les sinapsis de les cèl·lules ciliades de tipus I. Treballs recents d'electrofisiologia en mamífers (Dulon *et al.*, 2009) han demostrat l'activitat dels receptora AMPA a les sinapsis en calze per mitjà de la tècnica de *patch clamp*. Altres estudis immunohistoquímics i electrofisiològics en tortuga van demostrar l'existència i funcionalitat dels receptors AMPA a les sinapsis vestibulars (Bonsacquet *et al.*, 2006; Holt *et al.*, 2007).

2.2.7.4. Calretinina

La Calretinina també és coneguda com 29kDa calbindina, és una proteïna d'unió al calci depenent de la vitamina D, que està involucrada en la senyalització del calci. En els humans aquesta proteïna ve codificada pel gen CALB2. Es troba abundantment expressada a les neurones i als fol·licles pilosos.

En el sistema vestibular de la rata, la Calretinina marca les cèl·lules ciliades de tipus II i els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol, però no marca els calzes de les aferents de tipus dimòrfic.

2.3. Disfunció Vestibular

2.3.1. Conseqüències de la Disfunció del Sistema Vestibular

L'alteració de la funció del sistema vestibular provoca vertigen, pèrdua d'equilibri i pèrdua de mirada fixa durant el moviment, sovint acompanyada de marejos i nàusees, el que comporta l'increment en el risc de caigudes.

L'origen del vertigen pot ser central o perifèric. En el primer cas, el vertigen és degut a patologies del sistema nerviós central, tals com: l'esclerosi múltiple, que causa vertigen cerebel·lós degut a la degeneració de la beina de mielina de les neurones centrals; tumors com el neuroma acústic; accidents cerebrovasculars i traumatismes cranials, entre altres. El vertigen perifèric, és degut a patologies dels òrgans vestibulars, com per exemple: modificació de l'homeòstasi iònica de l'endolimfa, afectacions de la mecano-transducció, mort de les cèl·lules ciliades o de les neurones primàries vestibulars, així com afectació del contacte sinàptic entre les cèl·lules ciliades i les neurones vestibulars primàries sense que tingui lloc l'afectació cel·lular. Moltes d'aquestes patologies vestibulars són causades per ototoxicitat.

2.3.1.1. Pèrdua de Funció Vestibular amb l'Edat

La pèrdua de les funcions sensorials és un dels majors determinants del deteriorament de la qualitat de vida durant l'envelliment. Mentre que la presbiacúsia —pèrdua auditiva associada a l'edat, amb el consegüent increment de l'aïllament dels pacients, el que pot conduir a la depressió o fins i tot incrementar els casos de demència (Dalton *et al.*, 2003; Gates & Mills, 2005)— és un fenomen reconegut, la pèrdua de funció vestibular associada a l'edat és coneix molt menys, però té una incidència igualment elevada. Afecta més o menys al 65% i 85% de les persones majors de 60 i 80 anys respectivament, es veu alterat el seu patró de marxa i això constitueix un significatiu factor de risc per a les caigudes (Agrawal, 2009; Ishiyama, 2009).

2.3.1.2. Malaltia de Ménière

Prosper Ménière (1861) va examinar una sèrie de pacients que presentaven vertigen episòdic i pèrdua d'audició, i va descriure així els símptomes de disfunció del laberint de l'orella interna com una triada de símptomes: vertigen episòdic, pèrdua fluctuant de l'audició i acúfens —fenomen perceptiu que consisteix en notar sons a l'oïda que no procedeixen de cap font externa— (Baloh, 2001).

Les causes patogèniques de la malaltia són a dia d'avui encara desconegudes. S'han proposat diverses hipòtesis com la de Hallpike i Cairns (1938), els quals per mitjà d'estudis histològics van demostrar trencament del sac endolimfàtic i presència de teixit fibrós dins de l'os temporal. Des d'un punt de vista morfològic van observar un 75-100% de cèl·lules ciliades amb pèrdua dels seus estereocilis i un 69-82% de cèl·lules ciliades i cèl·lules de suport vacuolitzades (McCall *et al.*, 2009). A nivell ultraestructural, les aferències que innerven les cèl·lules ciliades internes i externes de la còclea són significativament menys nombroses, però no s'han proporcionat dades respecte a la innervació de les cèl·lules ciliades vestibulars (Nadol & Thornton, 1987).

S'han avançat diverses hipòtesis sobre les causes d'aquesta malaltia: mala absorció endolimfàtica, problemes vasculars, mecanismes autoimmunes després d'una infecció viral o modificacions de l'homeostasi hídrica (Merchant *et al.*, 1995; Ishiyama *et al.*, 2006). Malgrat la importància dels estudis realitzats en la malaltia de Ménière, el seu tractament es basa en un coneixement incomplet dels mecanismes fisiopatològics.

2.3.1.3. Neuritis Vestibular

Ruttin (1909) i Nysten (1924) van ser els primers en descriure els símptomes, però el terme neuritis vestibular no va ser utilitzat fins al 1952 per Dix i Hallpike, els quals van descriure una inflamació del nervi aferent (Dix & Hallpike, 1952).

Avui en dia, el diagnòstic de la neuritis vestibular es fa seguint diferents criteris: presència de vertigen agut i no recurrent sovint acompanyat de nàusees i vòmits resolts en dies o algunes setmanes, absència de signes coclears o trastorns del sistema nerviós central, presència de nistagmes espontanis —espasme clònic dels músculs motors del globus ocular que produeix moviments involuntaris en diferents sentits: horitzontal, vertical, oscil·latori, rotatori, mixt... El globus ocular es desvia lentament, i de seguida torna a la posició original—.

El retorn a la normalitat és incomplet en un 20% dels pacients amb una persistència del desequilibri postural, a més un 2% dels pacients que han presentat neuritis vestibular tenen una reincidència al cap de 29-39 mesos (Huppert *et al.*, 2006). La neuritis vestibular representa un 0.9-20% dels vertígens perifèrics (Bartual-Pastor, 2005; Wooltorton *et al.*, 2007).

Igual que té lloc en la malaltia de Ménière, la manca de coneixement dels mecanismes fisiopatològics és important i els tractaments actuals dels trastorns es dirigeixen únicament als símptomes. Els pacients reben anti-vertígens, per mitigar els vertígens, les nàusees i els vòmits, i corticosteroides per accelerar el retorn de la funció vestibular.

2.3.1.4. Ototoxicitat

En els éssers humans, una de les causes de la pèrdua de funció vestibular és la toxicitat d'alguns fàrmacs, com els antibiòtics aminoglicòsids —malgrat causar toxicitat a l'orella interna i al ronyó, s'utilitzen per tractar la tuberculosi i altres infeccions bacterianes potencialment mortals (Guthrie, 2008; Bitner-Glindzicz *et al.*, 2010; Tabuchi *et al.*, 2011), és el cas de l'estreptomycin i la gentamicina—, medicaments antipalúdics, diürètics de nansa, agents quimioterapèutics com el cisplatí (Rybak & Whitworth, 2005; Yorgason *et al.*, 2006; Schacht *et al.*, 2012), així com una sèrie de productes químics d'exposició laboral (Fechter *et al.*, 1998; Hoet & Lison, 2008; Saldaña-Ruiz *et al.*, 2012; Campo *et al.*, 2013). La diana principal de la toxicitat són les cèl·lules ciliades.

En moltes ocasions, la disfunció vestibular apareix progressivament com a resultat d'un estrès lleu i persistent del sistema, com té lloc en el tractament crònic amb aminoglicòsids. Si l'estrès s'elimina, els símptomes poden persistir completament o disminuir fins a una recuperació completa o incompleta (Black *et al.*, 2001, 2004).

2.3.1.5. Possibles Tractaments

El propòsit dels tractaments pel vertigen és controlar la causa de la crisi de vertigen, reduir la discapacitat funcional i millorar la qualitat de vida dels pacients, però hi ha poques opcions terapèutiques. Només existeixen maniobres de reposicionament, la cirurgia (Minor *et al.*, 2004) i la farmacologia que s'acompanya de diversos efectes secundaris. Entre els agents farmacològics disponibles es poden trobar compostos focalitzats en els canals iònics i els receptors de neurotransmissors i neuromoduladors implicats en els trastorns vestibulars.

Tot i la importància que tenen les cèl·lules ciliades, actualment no existeix un tractament del seu dany degut a la dificultat d'accedir a l'orella interna, ja que es troba situada a l'interior del crani (Sekiya *et al.*, 2007). Existeixen dues alternatives

d'administració local dels fàrmacs: administració intratimpànica i administració intracocular (Nuttall *et al.*, 1982; Banerjee & Parnes, 2004). Qualsevol fàrmac que s'utilitzi per via sistèmica ha de travessar la barrera hematococular, la qual és funcionalment i anatòmicament similar a la barrera hematoencefàlica (Juhn & Rybak, 1981; Juhn, 1988).

2.4. Els Nitrils

2.4.1. Generalitats dels Nitrils

Els nitrils són compostos orgànics que contenen grups cianur ($R-C\equiv N$). Aquests compostos es troben de forma abundant a la natura — presents a vegetals de consum humà en forma de glucòsids cianogènics (com la linamarina de la mandioca o l'amigdalina de les ametlles amargues) o d'aminonitrils (com els de les lleguminoses del gènere *Lathyrus*)— i són importants degut al seu creixent ús a la indústria (Ahmed & Farooqui, 1982) — presents en dissolvents, productes intermediaris de la síntesi de resines, plàstics i fibres artificials, productes farmacèutics i altres substàncies químiques (Fleming *et al.*, 2010)—. L'estudi dels nitrils és necessari ja que pot contribuir al coneixement en diversos camps de la medicina.

Els nitrils presenten diversos tipus de toxicitat, entre els que destaquen (DeVito *et al.*, 1996): 1) *letalitat aguda*, efecte comú de la família associat a vies de metabolització que provoquen l'alliberament de cianur; 2) *carcinogènesis de l'acrilonitril*, el principal nitril industrial; 3) *osteolatirisme*, una afectació òssia causada per aminonitrils (beta-aminopropionitril i aminoacetonitril); i 4) *neurotoxicitat*, terme genèric en el que es poden englobar múltiples efectes diferents. Aquesta neurotoxicitat de nitrils engloba una gran varietat de dianes, sorprenent per un petit grup de compostos de baix pes molecular i amb característiques estructurals semblants.

Els nitrils tenen una destacada presència als aliments. El consum humà o animal de determinats nitrils provoca símptomes similars a la intoxicació per cianur. Aquest fet

suggereix que en la metabolització d'aquests nitrils es produeix l'alliberament d'aquest compost, que és el responsable de la intoxicació aguda. Alguns nitrils alliberen menys cianur o ho fan d'una manera més lenta; aquests són els que provoquen neurotoxicitat i síndromes neurològiques. Els nitrils es metabolitzen principalment mitjançant el sistema microsomal hepàtic i provoquen una intoxicació letal per cianur (Silver *et al.*, 1982; Ahmed & Farooqui, 1982; Tani & Hashimoto, 1982, 1984). El mecanisme d'acció del cianur es basa en la seva afinitat per l'ió fèrric III del grup hemo de l'enzim citocrom a3 oxidasa mitocondrial. La unió del cianur amb aquest enzim bloqueja el transport d'electrons a la cadena respiratòria i com a conseqüència la fosforilació oxidativa.

2.4.2. Ototoxicitat dels Nitrils

Diversos nitrils mostren un patró d'efectes ototòxics (Crofton *et al.*, 1994; Llorens & Demêmes, 1994; Llorens *et al.*, 1998; Seoane *et al.*, 2001a, 2001b; Soler-Martín *et al.*, 2007) que es pot etiquetar com a "clàssic", és a dir, semblant al dels antibiòtics aminoglicòsids (Forge & Schacht, 2000). Això inclou l'aparent selectivitat per les cèl·lules ciliades, l'afectació tant del sistema auditiu com del vestibular, i la progressió de la degeneració segons un determinat ordre, com per exemple la major resistència del sàcul en comparació a utricles i crestes. Aquesta similitud també inclou l'efectivitat en diverses classes de vertebrats (mamífers, aus i amfibis), el que indica una notable preservació evolutiva de la seva diana d'acció (Soler-Martín *et al.*, 2007). S'ha vist que els nitrils causen efectes ototòxics en gran varietat d'espècies incloses les rates i els ratolins amb cap o poca mortalitat associada (Llorens *et al.*, 1993a; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena & Llorens, 2001; Boadas-Vaello *et al.*, 2005; Soler-Martín *et al.*, 2007; Saldaña-Ruíz *et al.*, 2012, 2013; Rúa *et al.*, 2013). Per tot això, a més del seu interès intrínsec, l'ototoxicitat de nitrils ofereix un model alternatiu als antibiòtics per definir les bases moleculars d'aquesta ototoxicitat "clàssica".

2.4.3. Característiques de l'IDPN

2.4.3.1. Toxicitat Sensorial de l'IDPN

La neurotoxicitat de l'IDPN (3,3'-iminodipropionitril) (Fig. I22) es va determinar en un principi pel quadre clínic permanent que provocava a les rates i als ratolins de laboratori, consistent en alteracions del comportament espontani (Delay *et al.*, 1952). Aquesta síndrome es caracteritza pels moviments repetitius i anòmals del cap, retropulsió, moviments en cercle, hiperactivitat i dificultats per nedar (Delay *et al.*, 1952; Thuillier & Burger, 1954) i s'anomena síndrome ECC (*Excitation with Choreiform and Circling movements*) (Selye, 1957) o síndrome del ball del vals (*Waltzing*) (Goldin *et al.*, 1948; Thuillier & Burger, 1954). Inicialment es va intentar explicar aquesta síndrome en termes patològics hipotetitzant que seria conseqüència de l'acció axonopàtica de l'IDPN. Tot i això, estudis posteriors han demostrat que l'IDPN provoca degeneració de les cèl·lules ciliades del vestíbul i que aquest efecte explica la síndrome comportamental (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens & Demêmes, 1994; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001b).

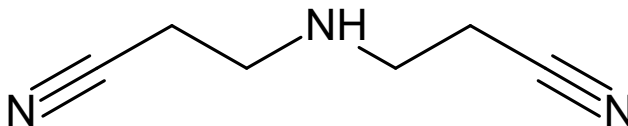


Figura I22. Estructura química de l'IDPN (3,3'-iminodipropionitril).

Estudis posteriors van evidenciar la toxicitat sensorial de l'IDPN: *toxicitat olfactiva* (Genter *et al.*, 1992) amb degeneració de l'epiteli olfactiv del meatus medial dorsal, *toxicitat auditiva* (Crofton *et al.*, 1994) amb pèrdua d'audició de les freqüències altes i posteriorment de les freqüències mitges, *toxicitat vestibular* (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens & Demêmes, 1994; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001a) amb degeneració de les cèl·lules ciliades vestibulars (Fig. I23) i *toxicitat visual* (Forgacs, 1960; Heath & Rutter, 1966; Barone *et al.*, 1995) amb opacitat de còrnia, degeneració i despreniment de retina, hemorràgies i exsudats inflamatoris intraoculars.

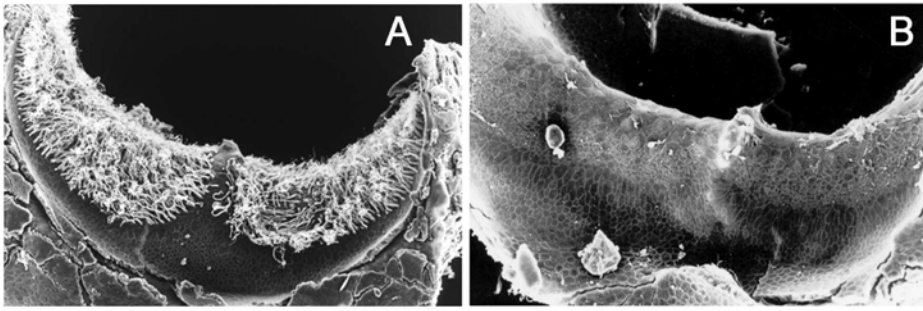


Figura 123. Microscòpia electrònica de rastreig de la cresta de la rata. **A.** Individu control. **B.** Individu administrat amb IDPN, on s'observa degeneració de les cèl·lules ciliades. Imatges adaptades de Llorens, Demêmes & Sans, 1993.

L'IDPN és un compost ototòxic que ofereix una flexibilitat única segons la dosi i la forma d'administració. Per una banda, per mitjà de l'exposició aguda s'observa a curt termini una preservació de les terminals vestibulars aferents mentre que les cèl·lules ciliades degeneren seguint patrons necròtics i apoptòtics (Llorens & Demêmes, 1994; Seoane *et al.*, 2001a). Per altra banda, el model d'IDPN crònic causa predominantment extrusió de les cèl·lules ciliades (Seoane *et al.*, 2001a). Aquesta evidència inicial d'extrusió de les cèl·lules ciliades ve precedida a les cèl·lules ciliades de tipus I per la pèrdua d'unió del calze aferent seguida per la retracció i fragmentació dels calzes (Seoane *et al.*, 2001b). L'efecte de l'IDPN sobre els neurofilaments és conegut (Chou & Hartmann, 1964; Griffin *et al.*, 1978; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997) i condueix a la pèrdua de neurofilaments a les aferències vestibulars (Seoane *et al.*, 2003) així com a les plaques motores (Soler-Martín *et al.*, 2012), podent tenir un paper en la patologia de les aferències després de l'exposició crònica (Seoane *et al.*, 2003).

2.4.3.2. Toxicitat Axonal de l'IDPN

Els primers estudis histopatològics van demostrar que l'IDPN causava dilatacions a l'axó proximal amb cúmuls de neurofilaments a les neurones motores i sensorials (Chou & Hartmann, 1964).

Aquest efecte està associat amb l'alteració del transport axonal d'aquestes proteïnes citoesquelètiques (Griffin *et al.*, 1978). S'ha observat una lesió similar en diverses malalties neurodegeneratives humanes, principalment a l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Carpenter, 1968). Apart d'aquest efecte, el sistema nerviós central roman bàsicament intacte després de l'exposició a IDPN i no té lloc una lesió major (Boadas-Vaello *et al.*, 2005).

Aquesta axonopatia neurofilamentosa proximal induïda pels nitrils està associada amb un contingut anormalment baix de neurofilaments a les terminals motores, amb un impacte potencial en l'estabilitat de la unió neuromuscular. No obstant, els neurofilaments estan mantinguts significativament en els axons distals i per tant els neurofilaments s'acumulen en els segments proximals dels axons (Soler-Martín *et al.*, 2012).

Un fenomen similar podria estar present a les neurones motores dels pacients amb esclerosi lateral amiotròfica (ELA), i pot ser un factor de risc que contribueix a la pèrdua d'adhesió entre la fibra muscular i la terminal motora. Es va comprovar que la pèrdua primerenca de neurofilaments a les unions neuromusculars en la patologia proximal d'IDPN donava lloc a la disfunció neuromuscular que conduïa a la desunió neuromuscular. Aquesta patologia està associada amb la pèrdua de neurofilaments a les terminals motores, debilitat motora i canvis estructurals en les unions neuromusculars, els quals suggereixen que la funció sinàptica està alterada tot i que hi ha una preservació de les unions neuromusculars a llarg termini (Soler-Martín *et al.*, 2014).

2.5. Ototoxicitat

2.5.1. Efecte de l'Ototoxicitat sobre les Cèl·lules Ciliades

Els fàrmacs ototòxics tant poden causar dany al sistema vestibular com al sistema auditiu. No obstant, és important tenir present que la recerca que es porta a terme en un dels sistemes pot no ser vàlida per l'altre. Mentre que els components

cel·lulars i moleculars són semblants en tots dos sistemes, existeixen diferències molt importants. La quantitat d'informació disponible per la toxicitat auditiva és molt superior a la disponible per la toxicitat vestibular, i moltes qüestions que s'han investigat en còclea romanen inexplorades en el sistema vestibular (Sedó-Cabezón *et al.*, 2014).

L'ototoxicitat ha estat estudiada *in vitro* per mitjà de cultius d'explants d'òrgans de Corti o d'epitelis vestibulars (Kotecha & Richardson, 1994; Forge & Li, 2000; Matsui *et al.*, 2004; Cunningham, 2006). Aquests estudis han aportat informació molt important de la resposta de les cèl·lules ciliades a l'estrès ototòxic. Encara que hi ha un ampli consens sobre que els components ototòxics estan definits per la seva toxicitat sobre les cèl·lules ciliades, és ben sabut que les terminals dendrítiques aferents i les corresponents neurones ganglionars també estan danyades (Ylikoski *et al.*, 1974; Koitchev *et al.*, 1982; Dau & Wenthold, 1985).

Diversos estudis han descrit que el dany a les terminals té lloc abans que a les cèl·lules ciliades. Hi ha estudis del sistema auditiu humà que demostren una primera pèrdua de les neurones auditives després de l'exposició ototòxica (Hinojosa & Lerner, 1987; Sone *et al.*, 1998). Es va registrar una disminució en el nombre de neurones ganglionars vestibulars en mostres d'humans afectats per ototoxicitat d'aminoglicòsids (Ishiyama *et al.*, 2005); d'acord amb els autors, la troballa era compatible amb una pèrdua secundària de les cèl·lules ciliades i amb un efecte tòxic directe dels antibiòtics a les neurones vestibulars. No obstant, aquests estudis difereixen de les descobertes més comuns on es descriu que la degeneració de les cèl·lules ciliades auditives precedeix a la degeneració neuronal, la qual normalment és interpretada com una degeneració secundària de les neurones ganglionars causada per la pèrdua de suport tròfic que té lloc després de la degeneració de les cèl·lules ciliades, les quals són la primera conseqüència ototòxica (Ernfors *et al.*, 1996; revisat per Schacht *et al.*, 2012).

Estudis experimentals amb animals van permetre arribar al consens que primer té lloc la pèrdua de les cèl·lules ciliades i que aquesta ve seguida d'una degeneració neuronal secundària (Ladrech *et al.*, 2004; Schacht *et al.*, 2012), la qual ve

acompanyada per la evidència de que el dany directe a les terminals també pot tenir lloc (Ruan *et al.*, 2014). Es va veure que les neurones ganglionars vestibulars sobreviuen més que les neurones espirals vestibulars després de la pèrdua de les cèl·lules ciliades (Jensen, 1983; Dupont *et al.*, 1993), però aquestes dades només donen suport a la hipòtesis de que els components ototòxics poden tenir un efecte tòxic directe sobre les neurones ganglionars a més a més del seu efecte sobre les cèl·lules ciliades (Sera *et al.*, 1987).

2.5.2. Ototoxicitat de l'IDPN

L'IDPN provoca la degeneració de les cèl·lules ciliades dels epitelis auditius i vestibulars (Llorens *et al.*, 1993; Llorens & Demêmes, 1994; Crofton *et al.*, 1994; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Soler-Martín *et al.*, 2007). L'efecte degeneratiu de l'IDPN afecta tota la superfície de l'epiteli sensorial vestibular però amb diferències intraepitelials de sensibilitat: són més sensibles les regions apicals de les crestes i l'estriola de les màcules (utricle i sàcul) que les regions més perifèriques d'aquests epitelis. També hi ha diferències interepitelials de sensibilitat: són més sensibles les crestes que els utricles i els sàculs (crestes > utricles > sàculs). Aquest patró regional de diferències de sensibilitat a l'IDPN és el mateix que està descrit per altres compostos vestibulotòxics com els antibiòtics aminoglicòsids (Aran *et al.*, 1982; Sera *et al.*, 1987; Takumida *et al.*, 1989). Els factors intrínsecs responsables d'aquestes diferències de sensibilitat no s'han identificat. Tot i això, s'han descrit característiques que varien entre les cèl·lules ciliades de diferents àrees de l'epiteli sensorial vestibular, i que inclouen el temps de maduració durant el desenvolupament (Sans & Chat, 1982), diversos tipus d'innervació aferent amb diferents propietats morfològiques, electrofisiològiques i bioquímiques (Baird *et al.*, 1988; Goldberg *et al.*, 1990; Desmadryl & Deschesne, 1992), i marcadors bioquímics específics de grups de cèl·lules ciliades (Deschesne *et al.*, 1988; Demêmes *et al.*, 1993). Es van descriure diferències de sensibilitat en els epitelis vestibulars en cultius tractats amb estaurosporina—un agent inductor d'apoptosis— el que recolza la hipòtesis que les diferències són degudes a factors intrínsecs (Forge & Li, 2000).

L'estudi histològic de la degeneració de l'epiteli vestibular de les rates exposades a IDPN mostra que les cèl·lules ciliades de tipus I són més sensibles que les de tipus II (Llorens & Demêmes, 1994), observació que s'ha descrit també amb altres vestibulotòxics com l'estreptomicina (Lee & Kimura, 1994). Després d'una exposició aguda d'IDPN, la degeneració de les cèl·lules ciliades es caracteritza per patrons morfològics de necrosis o d'apoptosis (Seoane *et al.*, 2001a). Malgrat que les fibres nervioses aferents i eferents es mantenen a l'epiteli vestibular durant la degeneració de les cèl·lules ciliades que innerven, s'observa una desaparició dels contactes entre les cèl·lules ciliades i la terminal nerviosa, i es perden també les densitats sinàptiques (Llorens & Demêmes, 1994). Aquesta observació contrasta amb la descripció de terminals nervioses en degeneració del SNC, on persisteixen les densitats pre i postsinàptiques, fins i tot després d'una degeneració completa del botó presinàptic (Gentshev & Sotelo, 1973). Posteriorment a la degeneració completa de les cèl·lules ciliades, s'evidencia una degeneració de les fibres nervioses, fet que suggereix que aquesta última esdevé com a efecte secundari a la toxicitat vestibular per IDPN (Llorens & Demêmes, 1994). Quan les alteracions ultraestructures de la cèl·lula ciliada són extenses, els estereocilis apareixen alterats (Llorens & Demêmes, 1994), de manera similar a la degeneració de les cèl·lules ciliades induïda per antibiòtics aminoglicòsids (Lenoir & Puel, 1987; De Groot *et al.*, 1991). A les rates exposades a IDPN, no s'han observat indicis de regeneració de les cèl·lules ciliades (Llorens *et al.*, 1993b), de manera que l'aparent recuperació funcional de les rates tractades amb dosis moderades d'IDPN es pot explicar com a resultat d'una compensació comportamental basada en la informació sensorial provinent de les cèl·lules ciliades restants en un epiteli vestibular parcialment lesionat (Llorens *et al.*, 1993b).

Sabent que les alteracions en el comportament espontani en rates sotmeses a una bilaberintectomia persisteixen com a mínim sis mesos postcirurgia sense que hi hagi cap compensació de les deficiències vestibulars per part dels sistemes visuals i propioceptius (Porter *et al.*, 1992), es suggereix que l'IDPN no només provoca l'aparició de la síndrome ECC sinó que és responsable de la seva permanència.

2.5.3. Models Experimentals en Recerca Ototòxica

La recerca experimental en el camp del dany ototòxic s'ha centrat en fàrmacs d'importància clínica, com els aminoglicòsids i els quimioterapèutics —cisplatí—. Dades dels ossos temporals de pacients exposats a aquests fàrmacs indiquen que les cèl·lules ciliades són la principal diana, i que la principal pèrdua d'audició o equilibri després de l'exposició a aquests compostos està associada amb la pèrdua de les cèl·lules ciliades (revisat per Guthrie, 2008; Schacht *et al.*, 2012).

En algunes espècies animals, els fàrmacs ototòxics tenen altres efectes tòxics que comprometen la supervivència, com és el cas de la toxicitat renal, això fa que sigui difícil establir un bon model animal per estudiar l'ototoxicitat. Les rates i els ratolins són comparativament resistent a la toxicitat de les cèl·lules ciliades induïda pels aminoglicòsids, mentre que els conills d'índies són molt més susceptibles a aquest tòxic i a més tenen l'avantatge de disposar d'una gran orella interna, és per aquest motiu que aquesta espècie ha estat freqüentment escollida (Li *et al.*, 1995; Forge & Schacht, 2000). Una altra espècie particularment sensible i utilitzada és la xinxilla (McFadden *et al.*, 2002; Yorgason *et al.*, 2011), també s'han publicat estudis en espècies d'aus (Mangiardi *et al.*, 2004) així com més recentment en peixos zebra (Chiu *et al.*, 2008). D'ençà del treball publicat per Wu *et al.* (2001), s'ha portat a terme un gran esforç en desenvolupar models d'ototoxicitat en rata i ratolí, amb el doble propòsit d'aconseguir entendre l'ototoxicitat *in vivo*, i causar lesions fàcils i reproduïbles per tal de desenvolupar estratègies de protecció, reparació i regeneració. En conjunt, aquests models han proporcionat una comprensió raonable de l'ototoxicitat aguda, però la comprensió de l'ototoxicitat crònica, més rellevant a la patologia humana, és molt menor. El progrés en aquesta àrea de recerca s'ha vist bloquejat, al menys en part, per la limitada flexibilitat dels models disponibles d'ototoxicitat crònica d'aminoglicòsids (revisat per Sedó-Cabezón *et al.*, 2014). En contrast amb els aminoglicòsids, l>IDPN és molt efectiu en rates i ratolins, així com en una gran varietat de models d'exposició (Llorens *et al.*, 1993; Seoane *et al.*, 2001a; Soler-Martín *et al.*, 2007).

Estudis d'exposició aguda en animals han demostrat clarament que els components ototòxics poden causar discapacitat permanent perquè causen la degeneració de moltes o totes les cèl·lules ciliades. Aquestes cèl·lules no poden regenerar o ho poden fer de manera limitada en algunes espècies de mamífers com el conill d'índies i la xinxilla i en qualsevol cas la recuperació funcional és limitada o nul·la (Forge *et al.*, 1993; Llorens *et al.*, 1993; Warchol *et al.*, 1993; Forge & Schacht, 2000; Groves, 2010; Rubel *et al.*, 2013). En peixos (Wilkins *et al.*, 1999), amfibis (Steyger *et al.*, 1997) i ocells (Adler & Raphael, 1996; Sone *et al.*, 1998; Roberson *et al.*, 2004) les cèl·lules ciliades es produeixen i es poden regenerar al llarg de tota la vida per tal de reemplaçar les que s'han perdut, les sinapsis es recuperen i la reparació del teixit està associada amb una recuperació funcional (Cotanche, 1987; Cruz *et al.*, 1987; Corwin & Cotanche, 1988; Tucci & Rubel, 1990; Carey *et al.*, 1996; revisat per Rubel *et al.*, 2013). Les noves cèl·lules ciliades procedeixen de les cèl·lules de suport seguides de dos possibles mecanismes: mitosis o transdiferenciació (Stone & Cotache, 2007; Collado *et al.*, 2011).

Aquestes evidències d'estudis experimentals no serveixen per explicar la recuperació funcional que té lloc en els humans després de la interrupció de l'exposició crònica ototòxica. Quan en pacients a qui s'ha diagnosticat ototoxicitat s'atura el tractament, els resultats són molt variables: des de la persistència completa dels símptomes fins una recuperació incompleta o completa (Black *et al.*, 2001, 2004). Encara que la recuperació comportamental es pot explicar en part per fenòmens de compensació al sistema nerviós central (McCall & Yates, 2011), es coneix molt poc sobre els mecanismes cel·lulars i moleculars involucrats en el dany vestibular crònic i la seva possible recuperació, així com la seva rellevància a nivell comportamental.

2.5.4. Apoptosis, Necrosis i Extrusió

2.5.4.1. Apoptosis vs. Necrosis en el Dany Ototòxic

Els mecanismes causants de la pèrdua de les cèl·lules ciliades per exposició ototòxica han estat estudiats en una gran varietat de models experimentals. Diversos estudis *in vivo* d'exposició aguda o repetida (Llorens & Demêmes, 1994; Li *et al.*, 1995; Vago *et al.*, 1998; Lenoir *et al.*, 1999; Seoane *et al.*, 2001a) analitzats mitjançant microscòpia electrònica de transmissió van permetre identificar més patrons de degeneració de les cèl·lules ciliades per apoptosis que per necrosis.

Una característica especial de la degeneració de les cèl·lules ciliades, la qual sembla que és part del programa apoptòtic de la cèl·lula, és el trencament del seu coll i l'alliberament de l'extrem apical, incloent la placa cuticular i el feix ciliar, cap a l'espai endolimfàtic. Simultàniament, les cèl·lules de suport tanquen el forat que s'ha format i preserven la integritat epitelial formant cicatrius característiques que impedeixen l'exposició de la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials cap a l'endolimfa rica en potassi (Forge, 1985; Leonova & Raphael, 1997).

Gràcies als resultats obtinguts utilitzant IDPN en el sistema vestibular de rata (Seoane *et al.*, 2001a), s'ha pogut establir que en aquest model la necrosis predomina, d'acord amb el criteri ultraestructural, després de dosis agudes, mentre que l'apoptosis predomina després d'exposicions progressives repetides. Aquesta observació concorda amb les dades obtingudes en el camp de la degeneració neuronal, la qual mostra necrosis en danys d'alta intensitat i apoptosis en baixa intensitat (Nicotera *et al.*, 1999).

2.5.4.2. Extrusió en el Dany Ototòxic

En els epitelis, la mort cel·lular es pot ocasionar per mitjà de l'extrusió de les cèl·lules des de la superfície luminal. L'exemple millor conegut d'extrusió és el de les cèl·lules de la mucosa intestinal, aquesta extrusió és part de la contínua renovació de

l'epiteli, ja que s'extrueixen les cèl·lules de la part apical de les vellositats contribuint a la generació de noves cèl·lules epitelials a les parts profundes de les criptes intestinals (Stappenbeck *et al.*, 1998).

Hi ha dades que indiquen que l'extrusió de les cèl·lules ciliades pot tenir lloc a la còclea dels mamífers (Whitworth *et al.*, 1999; Seoane *et al.*, 2005), però aquest fenomen no està ben documentat a l'epiteli auditiu i el més comú és trobar degeneració apoptòtica intraepitelial (Forge, 1985). Per contra, no hi ha cap dubte que l'extrusió té lloc a l'epiteli vestibular dels mamífers i a l'epiteli auditiu i vestibular dels no mamífers després d'una exposició ototòxica.

Un dels primers estudis que, específicament, abordava aquesta qüestió va identificar dos patrons de cèl·lules ciliades per microscòpia electrònica de rastreig a l'epiteli sensorial vestibular de conills d'índies exposats a gentamicina (Li *et al.*, 1995); es va observar que tenia lloc apoptosi de les cèl·lules ciliades a l'epiteli sensorial i extrusió de les cèl·lules ciliades vives a través de la cavitat endolimfàtica. Evidències d'aquest tipus de mort cel·lular també es van observar en altres mamífers (Wersall *et al.*, 1973) i han estat reconegudes com la principal forma de pèrdua de les cèl·lules ciliades en els vertebrats no mamífers (Cotanche, 1987; Corwin *et al.*, 1991).

Un aspecte menys clar és la relació que hi ha amb la velocitat d'intoxicació. És ben sabut, que hi ha tòxics que poden causar necrosis o apoptosi depenent de la seva concentració (Ankarcrona *et al.*, 1995; Bonfoco *et al.*, 1995; Gwag *et al.*, 1999; Nicotera *et al.*, 1999). Comparant exposicions agudes, subagudes i subcròniques d'IDPN, Seoane *et al.* (2001a) van observar en els epitelis vestibulars de la rata que la necrosis predominava després d'exposicions agudes, l'apoptosi predominada després d'exposicions subagudes, i l'extrusió de les cèl·lules ciliades predominava després d'exposicions subcròniques de baixa intensitat a través de l'aigua de beguda (Seoane *et al.*, 2001a, 2001b; Seoane & Llorens, 2005). Es va concloure que la manera de mort de les cèl·lules ciliades depenia de la intensitat de l'estímul perjudicial i que l'extrusió era la principal forma associada a l'ototoxicitat crònica de baixa intensitat. Així, l'extrusió seria una via per eliminar les cèl·lules ciliades danyades d'una manera controlada.

En alguns models particulars d'intoxicació, l'extrusió de les cèl·lules ciliades és la única forma de mort cel·lular a l'epiteli vestibular dels mamífers (Seoane *et al.*, 2001a, 2001b). Les rates exposades a IDPN crònic via l'aigua de beguda desenvolupen una pèrdua progressiva de la funció vestibular, que es revela amb alteracions comportamentals, associada a un procés de desaparició de les cèl·lules ciliades per mitjà de l'extrusió d'aquestes des de l'epiteli sensorial cap a la cavitat endolimfàtica (Seoane *et al.*, 2001a). Es van caracteritzar els efectes ultraestructurals de l'exposició subcrònica d'IDPN a l'epiteli sensorial (Seoane *et al.*, 2001b) i es va observar proextrusió i extrusió de les cèl·lules ciliades de les crestes i els utricles de rates exposades a IDPN 0.2% en aigua de beguda durant com a mínim 5 setmanes. Exposicions a temps menors, mostraren signes patològics com la formació d'una butllofa a la superfície apical de les cèl·lules ciliades, dilatació, retracció i fragmentació de les terminals nervioses aferents, separació de les cèl·lules ciliades de les estructures del voltant i pèrdua de les densitats pre i postsinàptica que caracteritzen les membranes que connecten les cèl·lules ciliades i les seves terminals aferents. En aquest model, les terminals aferents del calze que contacten amb les cèl·lules ciliades de tipus I se separen, es retreuen i es fragmenten abans de l'extrusió de les cèl·lules ciliades (Seoane *et al.*, 2001b). A partir de les observacions obtingudes en aquest treball es van proposar una seqüència d'esdeveniments que condueixen a la degeneració de l'epiteli i a l'extrusió de les cèl·lules ciliades (Fig. I24), i que suggerien una pèrdua de la integritat estructural de l'epiteli, que començaria a les terminals nervioses o als contactes cèl·lula-cèl·lula, i provocaria una lesió epitelial i la pèrdua de les cèl·lules ciliades.

No obstant, els mecanismes moleculars involucrats en l'extrusió de les cèl·lules ciliades no estan suficientment caracteritzats. Una hipòtesis àmpliament acceptada és que tant l'extrusió com l'apoptosis permeten la preservació de la integritat del teixit per tal de minimitzar el dany i la inflamació local (Li *et al.*, 1995; Seoane *et al.*, 2001a; Hirose *et al.*, 2004; Mangiardi *et al.*, 2004; Hordichok & Steyger, 2007).

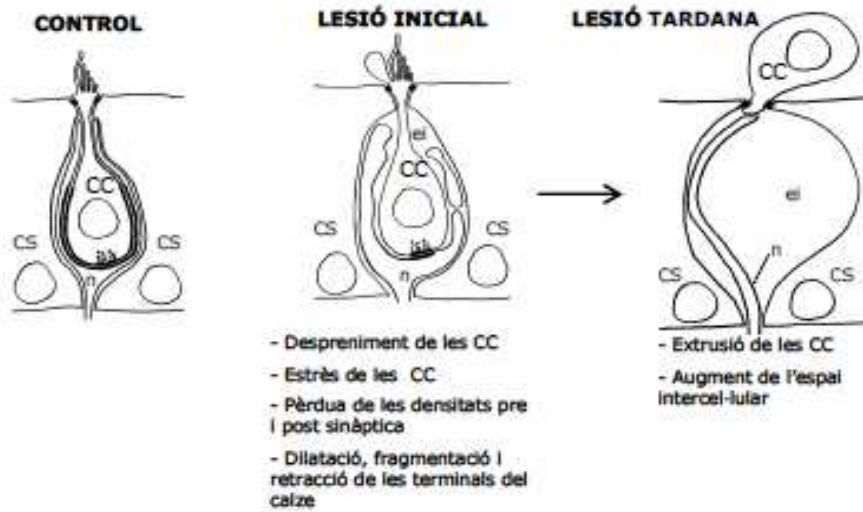


Figura 124. Evolució del procés d'extrusió que té lloc a les cèl·lules ciliades. CC cèl·lules ciliades. CS cèl·lules de suport. n termina nerviosa. ei espai intercel·lular. Imatge adaptada de Seoane et al., 2001b.

3. OBJECTIUS

L'**objectiu general** del projecte és avançar en el coneixement del dany i la possible reparació de la funció vestibular, associats amb la toxicitat crònica i la recuperació posterior. El caràcter crònic de la intoxicació fa que apareguin lentament símptomes d'ototoxicitat, els quals poden revertir parcialment o completament si es posa fi a l'exposició. Aquest procés de dany lent pot ser una diana terapèutica d'elecció per bloquejar la progressió abans que els esdeveniments irreversibles tinguin lloc. A més a més, és possible que els mecanismes de dany lleus estiguin involucrats en la pèrdua sensorial associada a l'edat. El procés de recuperació també pot ser una diana terapèutica d'elecció per disminuir el temps de recuperació i millorar el resultat final del procés. Conèixer els esdeveniments que tenen lloc durant el procés de dany i reparació indubtablement ajudarà a entendre la fisiologia i homeòstasi del sistema.

En aquest marc, la següent tesi engloba diversos **objectius concrets**:

1. Establir un protocol d'intoxicació i reparació que permeti estudiar les fases de dany i els fenòmens de reparació.
2. Determinar les lesions associades amb la disfunció persistent i aquelles associades amb la recuperació funcional.
3. Estudiar el comportament de les unions septades i els seus components moleculars en els processos de dany i reparació.
4. Estudiar el comportament de la maquinària sinàptica i els seus components moleculars en els processos de dany i reparació.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. Compostos Químics

- Albúmina (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche, 10 735 086 001).
- Alexa 488 anti-IgGs de conill (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A21206).
- Alexa 488 anti-IgGs de conill d'índies (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A11073).
- Alexa 488 anti-IgGs de ratolí (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A21202).
- Alexa 488 anti-IgG2a de ratolí (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A21131).
- Alexa 555 anti-IgGs de conill (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A31572).
- Alexa 555 anti-IgGs de ratolí (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A21425).
- Alexa 555 anti-IgG1 de ratolí (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A21127).
- Alexa 647 anti-IgGs de conill (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A31573).
- Alexa 647 anti-IgGs de ratolí (Molecular Probes[®], Invitrogen[™], A31571).
- Blau de toluïdina (Fluka[®] Analytical, 89640).
- Cacodilat (SIGMA[®], C0250).
- Calretinina anticòs policlonal de conill (Swant, 7699/3H).
- Caspr1 anticòs monoclonal clon K65/35 IgG1 (NeuroMab, 75-001).
- Caspr1 anticòs policlonal de conill d'índies (Manzoor Bhat, University of North Carolina).
- DDSA (Fluka[®] Analytical, 45346).
- DMP-30 (Fluka[®] Analytical, 45348).
- DRAQ5[™] (Cell Signaling TECHNOLOGY[®], 323DR50050).
- EPON (Fluka[®] Analytical, 45345).
- Etilenglicol $\geq 99\%$ (SIGMA-ALDRICH[®], 293237).
- Glicerol $\geq 99.5\%$ (SIGMA-ALDRICH[®], 49770).

- Glutamate receptor 2 (GluR2) anticòs monoclonal clon 6C4 IgG2a (Millipore, MAB397).
- Glutaraldèhid per microscòpia electrònica (SIGMA-ALDRICH[®], G5882 i Electron Microscopy Sciences, 16210).
- IDPN \geq 99%. (ACROS Organics[™], 412291000).
- KCNQ4 anticòs policlonal de conill (Bechara Kachar, National Institute on Deafness and Other Communication Disorders, NIH).
- KCNQ4 anticòs policlonal de conill d'índies (Thomas Jentsch, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin & Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie).
- KCNQ5 anticòs policlonal de conill (Álvaro Villarroel, Centro Mixto Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad del País Vasco, CSIC-UPV).
- Làmines de gelatina alimentària.
- Miosina VIIa anticòs policlonal de conill (Proteus Biosciences, 25-6790).
- Mowiol 4-88 (SIGMA-ALDRICH[®], 81381).
- NF200 anticòs monoclonal clon N52 (SIGMA, N0142).
- NF200 anticòs policlonal de conill (SIGMA, N4142).
- NMA (Fluka[®] Analytical, 45347).
- Paraformaldèhid (SIGMA-ALDRICH[®], 158127).
- PSD-95 anticòs monoclonal clon K28/43 IgG2a (NeuroMab, 75-028).
- Ribeye anticòs monoclonal clon 16/CtBP2 IgG1 (BD Transduction Laboratoires, 612044 161616).
- Sacarosa (MERCK, 1076541000).
- Sèrum d'ase (SIGMA[®], D9663).
- Tenascina-C anticòs policlonal de conill (Millipore, AB19013).

- Tetraborat de sodi (Panreac, 131644).
- Tetròxid d'osmi (Electron Microscopy Sciences, 19134).
- TritóTM X-100 (SIGMA[®], 93426).

4.2. Animals

Els experiments es van portar a terme a la Unitat d'Experimentació Animal de Bellvitge. L'ús i el tractament dels animals es va fer d'acord amb la Llei 5/1995 i el Decret 214/1997 de la Generalitat de Catalunya, sota l'aprovació del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona.

S'ha escollit la rata com a model animal per portar a terme aquest estudi per dos motius: 1) l'IDPN causa una limitada o nul·la mortalitat associada (Llorens, 1993; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena & Llorens, 2001; Soler-Martín *et al.*, 2007); 2) es disposa d'evidències anteriors amb aquest model animal (Seoane *et al.*, 2001a, 2001b).

Es van utilitzar diferents grups de rates Long-Evans mascles de 225-249g obtingudes del proveïdor comercial JANVIER.LABS (Rodent research models & associated services). Un cop les rates van arribar a l'estabulari van passar per un període de quarantena d'una setmana. Durant tot l'experiment les rates es van alimentar amb pinso 2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet (Harlan Laboratories) *ad libitum*, es van mantenir en un fotoperíode de 12h llum / 12h fosc (07:30-19:30h), a una temperatura de 22±2°C i una humitat relativa de 50±10%. Els animals es van estabular en grups de 2-3 individus per gàbia Panlab S.L. tipus 1000 de polipropilè per rata (215x465x145h mm).

Es van seguir les següents dosis i temps d'administració subcrònica de l'IDPN en l'aigua de beguda (Fig. M1). Es van utilitzar 82 rates que van ser exposades a 0mM (n=20, controls), 10mM (n=12) o 20mM (n=50) d'IDPN. De les rates exposades a

IDPN 10mM 4 (n=4) o 10 setmanes (n=8) i IDPN 20mM 4 (n=26), 6 (n=12) o 10 (n=12) setmanes, es van sacrificar la meitat al final del període d'exposició (10 setmanes 10mM i 4 o 10 setmanes 20mM) i l'altra meitat després del mateix període de recuperació de 4 o 10 setmanes. Els animals exposats durant 4 setmanes a IDPN 10mM es van sacrificar tots (n=4) al final del període d'exposició. Els animals exposats durant 6 setmanes a IDPN 20mM es van sacrificar al final del període d'exposició (n=4) o després de 6 (n=3) o 12 (n=4) setmanes de recuperació. Un nombre proporcional d'animals control es va sacrificar als mateixos períodes de temps per tal de processar les mostres en paral·lel.

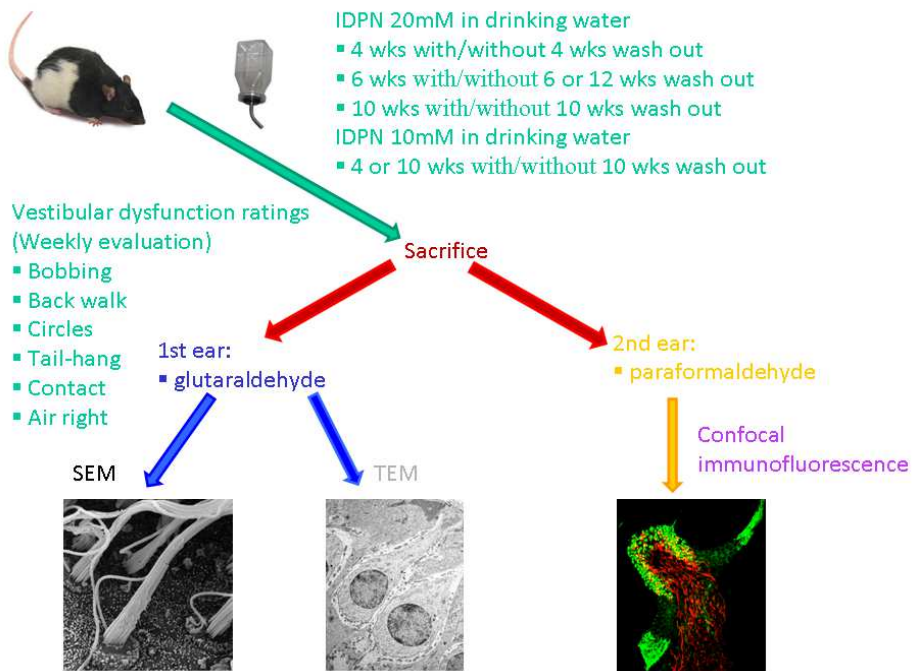


Figura M1. Disseny experimental de les dosis i temps d'administració subcrònica de l'IDPN en l'aigua de beguda i del posterior tractament de les mostres.

Cada setmana durant les avaluacions comportamentals de la disfunció vestibular es portava a terme la pesada dels animals i l'avaluació de l'estat de salut o de benestar general d'aquests, basada en el protocol de supervisió de Morton & Griffiths (1985) modificat per aquest experiment (Fig. M2).

El control general implicava la comprovació de l'estat dels animals, mitjançant la observació dels apartats a), b), c) i d), que estan descrits a continuació.

a) Pèrdua de pes:

- 0 Normal (no hi ha pèrdua de pes o l'animal creix normalment).
- 1 Pèrdua de pes inferior al 10%.
- 2 Pèrdua de pes entre el 10 i 20% (possible alteració en l'aspecte o quantitat de les femtes).
- 3 Pèrdua de pes superior al 20%.
- 10 Pèrdua de pes superior al 25% durant dos dies consecutius.

b) Aspecte:

- 0 Normal.
- 1 Pèl o pell en mal estat respecte als animals sense tractament.
- 2 Pèl o pell en mal estat i presència de secrecions nasals i/o oculars.
- 3 Postura anormal, excepte les associades amb la disfunció vestibular.

c) Comportament espontani:

- 0 Normal.
- 1 Petits canvis.
- 2 Inactivitat.
- 3 Vocalitzacions anormals, animals molt inquiets o immòbils.
- 10 Automutilació.

d) Comportament en resposta a la manipulació:

- 0 Normal.
- 1 Canvis petits.
- 2 Canvis moderats.
- 3 Animal agressiu.
- 10 Animal molt agressiu o comatós.

PUNTUACIÓ TOTAL de 0 a 33.

Nota: Quan un animal obté una puntuació de 3 en més d'un paràmetre tots els 3 passen a sumar 4. Les mesures correctores suggerides per cada animal en funció de la puntuació obtinguda després de sumar tots els apartats anteriors eren les següents:

- de 0 a 4 → Normal.
- de 5 a 9 → Supervisar curosament. Administrar salí glucosat.
- de 10 a 33 → Patiment intens. Eutanàsia.

Figura M2. Protocol d'avaluació de Morton i Griffiths modificat per aquest experiment.

4.3. Disseny Experiment

4.3.1. Avaluació Comportamental de la Disfunció Vestibular

Qualsevol canvi causat per un agent neurotòxic en alguna de les funcions sensorials, motores, sensori-motores o cognitives de l'individu afecta la seva relació amb l'entorn. Aquesta relació, que revela el funcionament integrat del sistema nerviós pot ser avaluada mitjançant tests comportamentals (Tilson & Mitchell, 1984). En neurotoxicologia humana, el comportament es pot avaluar mitjançant la informació subjectiva relatada per l'individu. En canvi, en els estudis amb animals, el disseny dels tests comportamentals és molt més complex. Treballs previs en aquest laboratori han permès desenvolupar tècniques comportamentals per avaluar el nivell de disfunció vestibular associada a la toxicitat vestibular de l'IDPN (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997). Aquestes tècniques consisteixen en una bateria de tests semiquantitatius que avaluen el comportament reflex i espontani, que combinats conjuntament donen com a resultat una bona indicació de l'estat funcional del vestíbul de la rata (Balbuena & Llorens, 2001, 2003; Boadas-Vaello *et al.*, 2005; Desmadryl *et al.*, 2012).

Es va portar a terme l'avaluació comportamental de la disfunció vestibular (VDR, *Vestibular Dysfunction Ratings* en anglès), cada setmana durant totes les setmanes de durada dels diferents tractaments amb IDPN. A cada test se li va donar una puntuació de 0 a 4 (0 no hi ha alteració, 1 pot haver-hi alteració però no de forma clara, 2 hi ha alteració clara però poc important, 3 alteració important i 4 alteració extrema), i la suma dels diferents tests es va utilitzar com a indicador del grau de disfunció vestibular, de manera que com més elevat és el valor major disfunció vestibular hi ha, sent 24 el valor màxim.

4.3.1.1. Avaluació del Comportament Motor Espontani

(Crofton & Knight, 1991).

Es van col·locar les rates durant un minut en un cub de vidre de 40x40cm i es van puntuar (Fig. M3):



Figura M3. Cub de vidre de 40x40cm on es porta a terme l'avaluació del comportament espontani.

- *Bobbings*: hiperextensió anòmal del cap enrere (Fig. M4).
- *Retropulsió (back walk en anglès)*: caminar enrere.
- *Caminar en cercles (circles en anglès)*: activitat estereotipada de locomoció en cercles.



Figura M4. Hiperextensió anormal del cap enrere en una rata amb disfunció vestibular causada per IDPN.

4.3.1.2. Avaluació del Reflex d'Aterratge (*tail-hang* en anglès) (Selye, 1957; Hunt *et al.*, 1987).

Es van aixecar les rates per la base de la cua, si la rata estirava les potes de davant (reflex d'aterratge) indicava que tenia la funció vestibular normal (Fig. M5.A), però si la rata es corbava s'obre ella mateixa en direcció ventral indicava dèficit vestibular (Fig. M5.B).

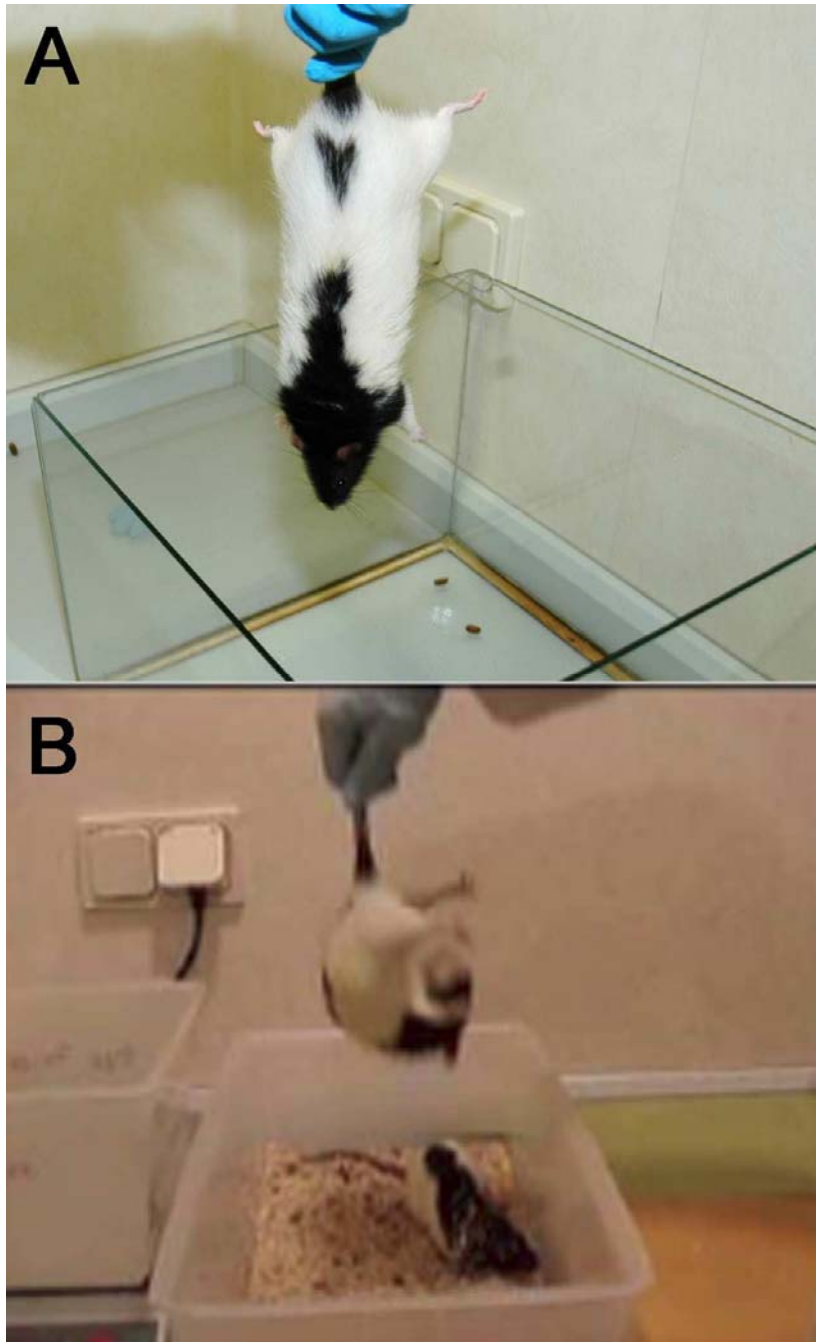


Figura M5. *Avaluació del reflex d'aterratge. A. Rata control sense alteració del reflex d'aterratge. B. Rata administrada amb IDPN subcrònic a l'aigua de beguda amb reflex d'aterratge anormal.*

4.3.1.3. Avaluació del Reflex d'Incorporació (*contact en anglès*)
(Shoham *et al.*, 1989; Ossenkopp *et al.*, 1990).

Es van col·locar els animals en posició decúbit supí sobre una superfície horitzontal i se'ls hi va col·locar una superfície en contacte amb les potes (Fig. M6). Els animal que no tenien lesió vestibular es giraven espontàniament, mentre que els que tenien lesió vestibular restaven en aquesta posició i es movien com si caminessin del dret.



Figura M6. Avaluació del reflex d'incorporació.

4.3.1.4. Avaluació del Reflex d'Incorporació en l'Aire (*air right en anglès*)
(Ossenkopp *et al.*, 1990).

Es sostenien les rates amb la mà en posició decúbit supí a 40cm d'una superfície tova i es deixaven caure. Les rates control es giraven i queien de 4 potes mentre que les lesionades queien d'esquena.

4.3.2. Avaluació Histològica dels Epitelis Vestibulars

4.3.2.1. Dissecció Aparell Vestibular

Per tal d'analitzar les lesions histològiques dels epitelis vestibulars es van agrupar les rates en parelles (o trios) segons la seva puntuació VDR a les 4 setmanes de tractament; una de les rates es va sacrificar al final de l'administració amb IDPN i l'altra(es) es va(van) deixar per recuperació.

Per portar a terme els estudis histològics, es van anestesiari les rates amb Ketamina (IMALGENE[®] 1000) 90mg/Kg i Xilacina (Rompún[®]) 10mg/Kg per via intraperitoneal (i.p.), i es van decapitar.

Els ossos temporals es van submergir immediatament en solució fixadora freda, i es va procedir a la dissecció de l'aparell vestibular (3 crestes, utricle i sàcul) dels dos hemisferis (Fig. M7) a la vitrina de gasos.

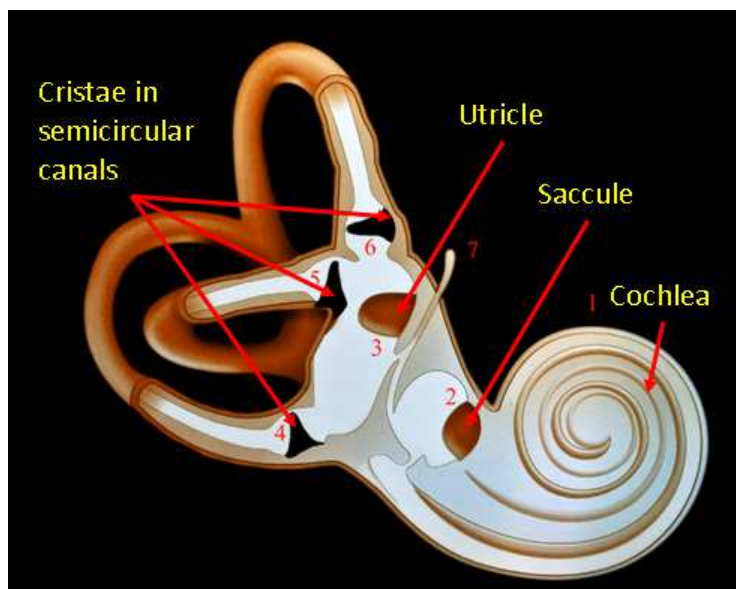


Figura M7. Esquema del sistema vestibular, on s'observa la distribució dels diferents epitelis vestibulars: les 3 crestes, l'utricle i el sàcul. Font Wikimedia Commons, Autor Didier Descouens.

L'hemisferi utilitzat per microscòpia electrònica (SEM i TEM) es va disseccionar, en menys de 5 minuts després de la decapitació, en solució fixadora de glutaraldèhid 2.5% en tampó cacodilat 0.1M a pH 7.2; mentre que l'altre hemisferi es va utilitzar per immunofluorescència i microscòpia òptica confocal, i es va disseccionar en solució fixadora de paraformaldèhid 4% en tampó fosfat 0.1M a pH 7.4 en menys de 15 minuts des de la decapitació dels animals. Les mostres es van codificar individualment per tal de correlacionar els resultats obtinguts en microscòpia electrònica i immunohistoquímica amb l'avaluació comportamental de la disfunció vestibular (VDR).

4.3.2.2. Microscòpia Electrònica

Es van netejar les membranes que recobrien els epitelis sensorials, i es van post-fixar amb glutaraldèhid 2.5% en tampó cacodilat 0.1M a pH 7.2 a 4°C ON (una nit). Dels cinc epitelis vestibulars que s'obtenen de cada hemisferi es van utilitzar dues crestes, l'utricle i el sàcul per microscòpia electrònica de rastreig; i la cresta restant es va reservar per microscòpia electrònica de transmissió.

Preparació de 10mL d'Osmi:

1. Agafar una ampolla petita de 25mL, posar una mosca especial per a osmi al seu interior i col·locar-la damunt de l'agitador magnètic.
2. Mesurar 10mL de cacodilat 0.1M a pH 7.2 i afegir-lo a l'ampolla.
3. Trencar un vial d'osmi i llençar-lo dins de l'ampolla.
4. Deixar agitar durant 2 hores a TA (Temperatura Ambient) protegit de la llum.
5. Un cop dissolt guardar a 4°C ben tapat amb parafilm i protegit de la llum per evitar la seva oxidació.

Figura M8. Preparació del tetròxid d'osmi utilitzat en la post-fixació dels epitelis vestibulars.

Els teixits es van netejar amb cacodilat 0.1M a pH 7.2 (dos rentats de 5 minuts cadascun), es van post-fixar amb tetròxid d'osmi 1% (Fig. M8) en tampó cacodilat a pH 7.2 durant 1h, es van netejar amb cacodilat 0.1M a pH 7.2 (dos rentats de 5 minuts cadascun), i es van deixar en alcohol 70° fins l'endemà.

4.3.2.3. Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM)

Els epitelis fixats amb tetròxid d'osmi es van encapsular en un vial cobert per dues membranes poroses: una de 0.22 μ m (MERCK MILLIPORE, FGLP01300) i l'altra de 0.8 μ m (Whatman®, 7060-1308) que permetien la difusió de l'aigua i l'etanol per portar a terme el procés de deshidratació (Fig. M9).

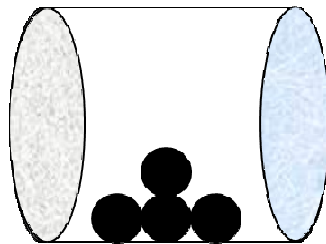


Figura M9. Vial utilitzat per encapsular els epitelis vestibulars i portar a terme el procés de deshidratació. En gris s'observa una de les membranes poroses i en blau l'altra. Els punts negres representen els epitelis vestibulars encapsulats.

Es va procedir a deshidratar les mostres amb concentracions creixents d'etanol; dues deshidratacions amb alcohol 96° durant 30 minuts cadascuna, dues deshidratacions amb alcohol 100° de 30 minuts cadascuna i una última deshidratació amb alcohol 100° ON. Al dia següent es va procedir a assecar les mostres mitjançant el punt crític, que utilitza CO₂ líquid, a la Unitat de Microscòpia Electrònica de Rastreig dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB), a continuació es van muntar les mostres damunt d'un suport circular, i seguidament es van recobrir amb 5nm d'or.

Les mostres es van guardar al buit fins la seva observació al microscopi electrònic de rastreig ESEM Quanta 200 FEI, XTE 325/D8395 a 20kV de voltatge.

4.3.2.4. Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM)

Seguidament a la fixació amb tetròxid d'osmi es va procedir a la realització del protocol de deshidratació de les crestes i inclusió en resina EPON (Epoxy embedding medium) (47.28% EPON, 18.04% DDSA, 32.16% NMA, 2.52% DMP-30) (Fig. M11). Dues deshidratacions amb alcohol 96° de 15 minuts cadascuna, tres deshidratacions amb alcohol 100° de 15 minuts cadascuna, una impregnació amb $\frac{2}{3}$ d'alcohol 100° i $\frac{1}{3}$ d'EPON durant 30 minuts, una impregnació amb $\frac{1}{2}$ d'alcohol 100° i $\frac{1}{2}$ d'EPON durant 30 minuts, una impregnació amb $\frac{1}{3}$ d'alcohol 100° i $\frac{2}{3}$ d'EPON durant 1 hora i finalment la inclusió en EPON ON a 4°C en agitació lenta.

Al dia següent es van orientar les crestes en motlles d'agar amb EPON nou (Fig. M10) i es van posar a l'estufa a 37°C fins l'endemà. Es va passar l'estufa a 45°C durant un dia i finalment a 60°C durant 3 dies.

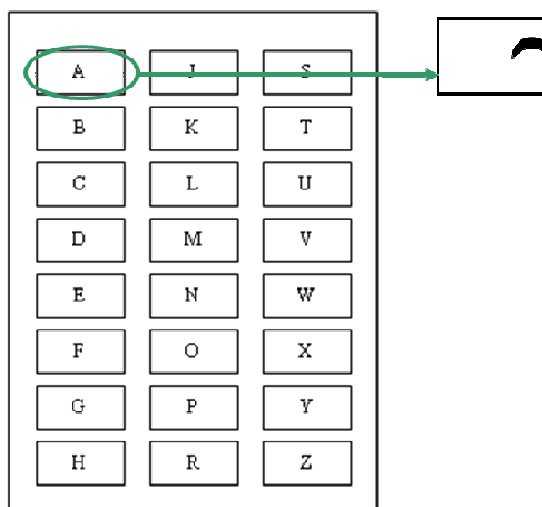


Figura M10. Orientació correcta de la cresta al pouet del motlle.

Preparació de 50mL d'EPON:

La preparació de l'EPON es porta a terme el dia abans de la seva utilització. Preparar la quantitat exacta a utilitzar.

1. Mesurar 23.64mL EPON amb una xeringa i abocar-ho en un recipient de plàstic exclusiu per preparar EPON.
2. Col·locar el recipient amb una mosca per substàncies denses damunt de l'agitador magnètic.
3. Mesurar 9.02mL DDSA amb una xeringa i abocar-ho al recipient amb EPON.
4. Mesurar 16.08mL NMA amb una xeringa i abocar-ho al recipient amb la barreja anterior.
5. Quan estiguin tots els components ben barrejats, mesurar 1.26mL DMP-30 (accelerador), submergir la xeringa a la barreja i abocar l'accelerador barrejant amb la xeringa.
6. Agitar fins la total dissolució.
7. Fer 5 alíquotes de 10mL i guardar-les a 4°C fins al dia següent.

Figura M11. Preparació de la composició de resina EPON utilitzada per la inclusió de les mostres per microscòpia electrònica de transmissió.

Es van piramidar els blocs d'EPON i es van realitzar seccions semifines transversals d'1µm a la part central de la cresta amb el Micròtom REICHERT-JUNG 366454, LEICA MICROSISTEMAS, S.A. (Fig. M12), es van tenyir els talls semifins amb blau de toluïdina 1% (Fig. M13) i es van examinar al microscopi òptic Jenalumar.



Figura M12. Ultramicròtom REICHERT amb ampliació del bloc d'EPON i de la ganiveta. Aquest recipient s'omple d'aigua destil·lada i filtrada i allà queden les seccions d'1µm flotant.
Font Meyer Instruments, Leica Microsystems.

Preparació de 100mL de blau de Toluïdina:

1. Col·locar un vas de precipitats amb una mosca damunt de l'agitador magnètic.
2. Pesar 1g de tetraborat de sodi.
3. Pesar 1g de blau de Toluïdina en un potet de plàstic amb aquesta finalitat.
4. Mesurar 100mL d'aigua destil·lada.
5. Dissoldre el tetraborat de sodi i el blau de Toluïdina amb aigua destil·lada.
6. Filtrar la solució directament a l'ampolla on s'emmagatzemarà amb un paper de filtre de grau 1.
7. Recobrir l'ampolla amb paper de plata per preservar la solució de la llum.

Figura M13. Preparació del blau de Toluïdina necessari per la tinció dels semifins.

Un cop es va seleccionar la zona d'elecció, es van realitzar els talls ultrafins i es van tenyir amb acetat d'uranil i citrat de plom a la Unitat de Microscòpia Electrònica dels CCiTUB de la Facultat de Medicina, i es van examinar al microscopi electrònic de transmissió Jeol 1010 a 75-80 kV.

4.3.2.5. Immunohistoquímica i Microscòpia Òptica de Fluorescència Confocal

Un cop es va dur a terme la dissecció del vestíbul es va procedir a la neteja de les membranes que recobren els epitelis sensorials, per tal que hi hagués una correcta permeabilització tant dels anticossos primaris com dels secundaris; i es van post-fixar els epitelis sensorials amb paraformaldèhid 4% durant 1 hora a temperatura ambient.

Els epitelis sensorials es van netejar dues vegades amb PBS 1x a pH 7.2 durant 20 minuts a temperatura ambient. Tot seguit es van submergir en solució crioprotectora (34.5% glicerol, 30% etilenglicol, 20% PBS i 15.5% aigua destil·lada) i es van deixar temperar. Un cop els epitelis van estar temperats es van criopreservar a -20°C fins el dia que es van utilitzar. Per utilitzar els epitelis criopreservats es va procedir a realitzar els passos contraris, és a dir, es van fer dos rentats de 20 minuts amb PBS 1x a pH 7.2.

Es va portar a terme la immunohistoquímica dels epitelis sencers. Per evitar biaixos generats per les diferències diàries en el marcatge, es va utilitzar el mateix nombre d'epitelis de cada grup experimental, per tal de processar-los en paral·lel al llarg de tots els passos del protocol d'immunomarcatge.

Tot seguit els teixits fixats es van preincubar durant 90 minuts a TA en agitació lenta amb 4% TritóTM X-100 i 20% sèrum d'ase en PBS. Les mostres es van incubar amb els anticossos primaris (Fig. M14) més 0.1% TritóTM X-100 i 1% de sèrum d'ase en PBS 1% durant 48h a 4°C en agitació lenta. Es van fer quatre rentats de 10 minuts cadascun amb PBS en agitació lenta a TA i es van incubar amb els anticossos secundaris (Fig. M15) més 0.1% TritóTM X-100 en PBS 1% ON a 4°C en agitació lenta.

ANTICOSSOS PRIMARIS	CONCENTRACIÓ
Calretinina policlonal de conill	1/500
Caspr1 monoclonal clon K65/35	1/400
Caspr1 policlonal de conill d'índies	1/1000
GluR2 monoclonal clon 6C4 IgG2a	1/100
KCNQ4 policlonal de conill	1/1000
KCNQ4 policlonal de conill d'índies	1/200
KCNQ5 policlonal de conill	1/500
Miosina VIIa policlonal de conill	1/400
NF200 monoclonal clon N52	1/1000
NF200 policlonal de conill	1/1000
PSD-95 monoclonal clon K28/43 IgG2a	1/200
Ribeye monoclonal clon 16/CtBP2 IgG1	1/100
Tenascina-C policlonal de conill	1/200

Figura M14. Informació dels anticossos primaris utilitzats.

ANTICOSSOS SECUNDARIS	CONCENTRACIÓ
Alexa 488 conill	1/500
Alexa 488 conill d'índies	1/500
Alexa 488 ratolí	1/500
Alexa 488 ratolí IgG2a	1/500
Alexa 555 conill	1/500
Alexa 555 ratolí	1/500
Alexa 555 ratolí IgG1	1/500
Alexa 647 conill	1/500
Alexa 647 ratolí	1/500

Figura M15. Informació dels anticossos secundaris utilitzats.

Es van fer quatre rentats de 10 minuts cadascun amb PBS en agitació lenta a TA i es van incloure les mostres en gelatina líquida (0.49% gelatina, 30% albúmina i 20% sacarosa en PBS 1x) (Fig. M16) ON a 4°C en agitació lenta.

Preparació de 100mL de gelatina:

1. Mesurar 100mL de PBS 1x i passar-los a un erlenmeyer.
2. Pesar 0.49g de làmines de gelatina alimentària i afegir al PBS 1x.
3. Bullir el PBS+gelatina al microones fins que es dissolgui.
4. Deixar temperar a TA i col·locar damunt de l'agitador magnètic amb la mosca.
5. Afegir 30g d'albúmina a poc a poc fins a la completa dissolució.

NOTA: L'albúmina tarda bastant en dissoldre's, cal tenir paciència i esperar fins a la completa dissolució per tal de tenir un gelatina òptima per inclusió.

6. Un cop dissolta l'albúmina, afegir 20g de sacarosa.
7. Fer alíquotes i guardar a -20°C.
8. Un cop descongela l'alíquota guardar a 4°C i gastar en un màxim de 3 dies.

Figura M16. Preparació de la gelatina utilitzada en la inclusió dels epitelis vestibulars per immunohistoquímica.

En els casos que es va utilitzar el marcador de nuclis DRAQ5TM a concentració 1/1000, després del marcatge amb els anticossos secundaris es va procedir a fer quatre rentats de 10 minuts amb PBS en agitació lenta a TA. Tot seguit es va procedir a la incubació amb DRAQ5 durant 15 minuts a temperatura ambient i màxima foscor, seguit de tres rentats de 5 minuts amb PBS a temperatura ambient, agitació lenta i màxima foscor abans de procedir a la inclusió amb gelatina líquida ON a 4°C en agitació lenta.

Es va fer un llit de gelatina + 9% glutaraldèhid en un motlle circular d'1.5cm de diàmetre i es va deixar solidificar durant 5 minuts. Passat aquest temps es va retirar l'epiteli vestibular de la gelatina líquida i es va col·locar al centre del llit solidificat tenint cura d'orientar correctament la mostra: les crestes en posició lateral damunt del

llit de gelatina sòlida (Fig. M17.A), i els utricles i sàculs en posició decúbit supí deixant l'epiteli ciliar exposat cap a dalt (Fig. M17.B).

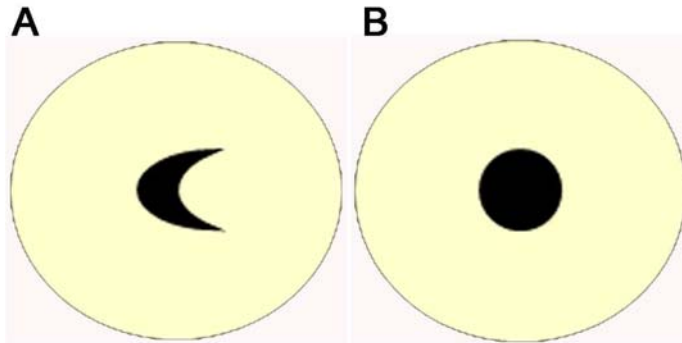


Figura M17. Orientació dels epitelis vestibulars damunt del llit de gelatina. **A.** Orientació correcta de les crestes. **B.** Orientació correcta dels utricles i sàculs.

Amb un trosset de paper es va retirar l'excés de gelatina líquida que pogués haver quedat al voltat de la mostra, tenint cura de no tocar l'epiteli ciliar, per tal de garantir una correcta inclusió d'aquest. Tot seguit, els epitelis es van recobrir amb gelatina + 9% glutaraldèhid i es van deixar solidificar durant 15 minuts. Posteriorment es van piramidar (Fig. M18) i post-fixar amb paraformaldèhid 4% en tampó fosfat 0.1M a pH 7.4 ON a 4°C.

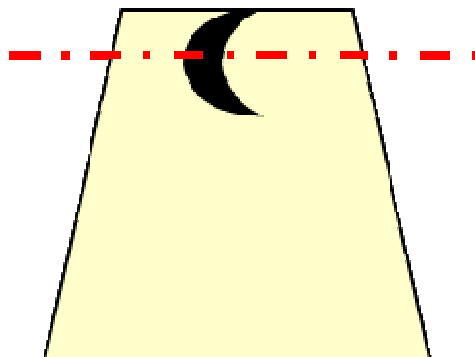


Figura M18. Piramidació del bloc de gelatina i talls transversals de 40µm amb el vibràtom.

El bloc de gelatina amb la mostra es va enganxar amb Loctite (Super Glue-3) sobre el suport del vibràtom en posició vertical, deixant el llit de gelatina sòlida darrere (davant de la ganiveta de tall), per tal de realitzar talls transversals dels epitelis vestibulars. Es van fer seccions de 40 μ m al vibràtom Leica VT 1000M (Fig. M19), els talls es van muntar amb Mowiol 4-88 (Fig. M20) i es van deixar assecar ON a 4°C.



Figura M19. Vibràtom Leica. Font Meyer Instruments, Leica Microsystems.

Preparació de 50mL de Mowiol:

1. Mesurar 12mL de glicerol, col·locar-lo en un vas de precipitats amb una mosca damunt de l'agitador magnètic a la campana.
2. Pesar 4.8g de Mowiol i afegir-los al glicerol.
3. Dissoldre durant 1 hora protegit de la llum.
4. Afegir 12mL d'aigua destil·lada i agitar durant 2 hores.
5. Afegir 24mL de Tris-HCl 0.2M pH 8.5.
6. Incubar en un bany d'aigua a 50°C (pas crític) durant 3 hores aproximadament fins a una completa dissolució. Remenar ocasionalment.
7. Fer alíquotes i guardar a -20°C.

Figura M20. Preparació del Mowiol empleat en el muntatge dels talls de 40 μ m.

Els talls es van observar al microscopi confocal Leica TCS-SL de la Unitat de Microscòpia Òptica Avançada dels CCiTUB del Campus de Bellvitge utilitzant sempre les mateixes condicions per a les observacions i adquisicions de les imatges (Fig. M21).

<p>Condicions emprades en l'observació i adquisició de les imatges:</p> <ul style="list-style-type: none">- Objectiu → 63X- Zoom → 2- Series → 25µm- Seccions → 0.5µm

Figura M21. Paràmetres estàndards establerts per l'observació i adquisició de les imatges al microscopi Leica TCS-SL.

Els *settings* (ajustos) dels diferents làsers d'excitació 488, 555 i 647, que es van utilitzar per cada una de les immunohistoquímiques, es van establir amb els individus control i es van mantenir pels individus tractats i pels individus amb procés de recuperació, per tal de tenir valors de fluorescència comparables i quantitativament analitzables.

4.4. Anàlisi d'Imatge

4.4.1. Quantificació de Caspr1 i KCNQ4 a la cara interna i externa del calze de les cèl·lules ciliades de tipus I

Les imatges es van tractar amb el programa Leica LCS Lite per tal de separar els 25µm observats de cada epiteli vestibular en blocs de 3µm, que van ser els emprats per portar a terme la quantificació de la fluorescència de les diferents proteïnes.

Es va procedir a quantificar la fluorescència mitjana de Caspr1 i KCNQ4 de la cara interna i externa del calze, utilitzant les unitats arbitràries de fluorescència. Amb el

programa de tractament d'imatge Image J i establint una distància de mesura de 15µm (Fig. M22) es van quantificar 10 cèl·lules ciliades per animal i 3 animals per condició experimental. La quantificació es va portar a terme sempre a la mateixa alçada mitja de la cèl·lula ciliada. Els resultats dels anàlisis de la fluorescència es comentaran a l'apartat de Resultats.

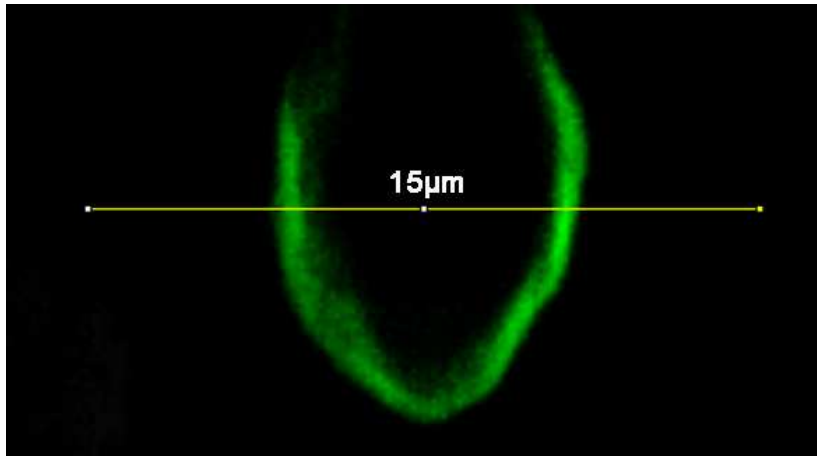


Figura M22. Quantificació de la fluorescència mitjana de Caspr1 i KCNQ4 de la cara interna i externa del calze per mitjà d'una línia de 15µm.

Totes les dades de fluorescència mitjana \pm la desviació estàndard de les cares interna i externa de les cèl·lules ciliades de tipus I de les diferents condicions experimentals es van representar en un gràfic lineal i en un gràfic de barres, però els resultats i anàlisis dels gràfics ja els tractarem a l'apartat de Resultats.

4.4.2. Quantificació de la fluorescència total de Caspr1 i Tenascina-C de les cèl·lules ciliades de tipus I

Les imatges es van tractar amb el programa Leica LCS Lite per tal de separar els 25µm observats de cada epiteli vestibular en blocs de 3µm, que van ser els emprats per portar a terme la quantificació de la fluorescència de les diferents proteïnes.

Es va quantificar la fluorescència mitjana de Caspr1 i Tenascina-C de les cèl·lules ciliades de tipus I, utilitzant les unitats arbitràries de fluorescència. Amb el programa de tractament d'imatge Leica LCS Lite i establint una àrea de $100\mu\text{m}^2$ per cèl·lula (Fig. M23), es van quantificar 10 cèl·lules ciliades per animal i 3 animals per condició experimental.

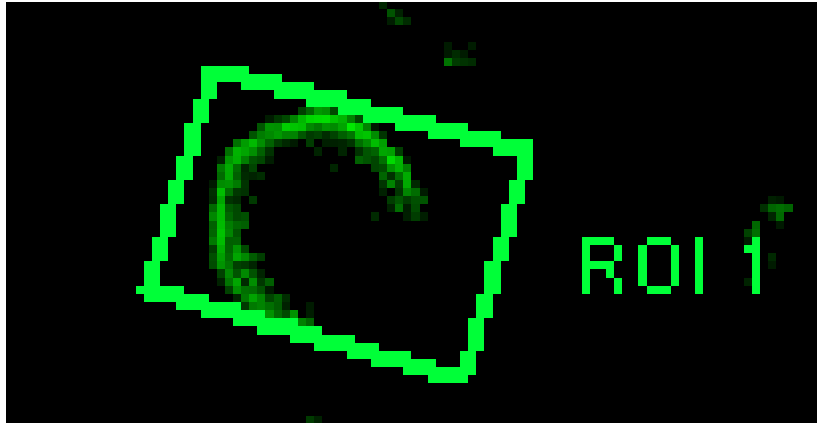


Figura M23. Quantificació de la fluorescència mitjana de Caspr1 i Tenascina-C per mitjà d'una àrea de $100\mu\text{m}^2$ (ROI).

Els resultats es van representar en un gràfic de barres per mitjà de la mitjana \pm la desviació estàndard per Caspr1 i Tenascina-C per cada una de les condicions experimentals (control, IDPN i recuperació), els resultats dels anàlisis de fluorescència ja els comentarem a l'apartat de Resultats.

4.4.3. Quantificació dels contactes sinàptics Ribeye, PSD-95 i GluR2 de les cèl·lules ciliades de tipus I i de les de tipus II

Les imatges es van tractar amb el programa Leica LCS Lite per tal de separar els $25\mu\text{m}$ observats de cada epiteli vestibular en blocs de $5\mu\text{m}$, que van ser els emprats per portar a terme la quantificació de la fluorescència de les diferents proteïnes.

Es va quantificar la quantitat de cada un dels components dels contactes sinàptics pels diferents tipus d'unitats funcionals –calze de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferent calze sol (CCIco), calze de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferent dimòrfic (CCId) i cèl·lules ciliades de tipus II (CCII), segons el seu marcatge amb Calretinina– i la seva col·localització. La Calretinina marca els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferent de tipus calze sol que es troben a la zona central de la cresta i les cèl·lules ciliades de tipus II que es troben a la zona perifèrica d'aquesta (Fig. M24), els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferent de tipus dimòrfic no estan marcades amb Calretinina. Aquest marcatge permet diferenciar els diferents tipus d'unitats funcionals.

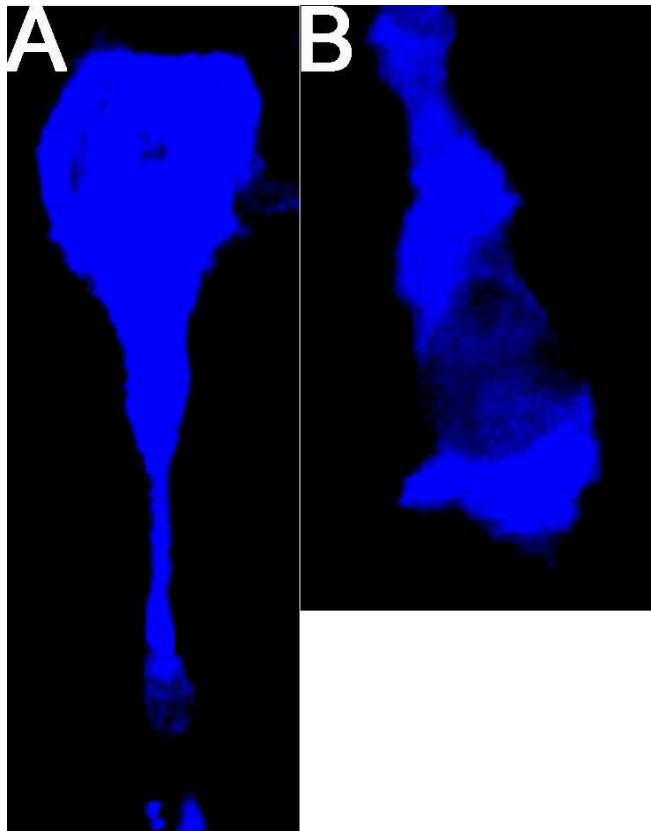


Figura M24. Marcatge amb Calretinina de les unitats funcionals. **A.** Calze d'una cèl·lula ciliada de tipus I amb aferent de tipus calze sol. **B.** Cèl·lula ciliada de tipus II.

4.5. Anàlisis Estadístiques

Els resultats es van representar com la mitjana \pm desviació estàndard. Les anàlisis estadístiques d'avaluació de la disfunció vestibular es van portar a terme amb el programa estadístic IBM SPSS Statistics 20.

Els resultats de comportament van ser analitzats amb el test de lambda de Wilks de MANOVA de mesures repetides i el nivell de significació α es va situar a $p < 0.05$. En els casos que no havia suficients graus de llibertat es va aproximar al test de Greenhouse-Geiser de mesures repetides ANOVA.

La dosi i l'efecte de l'IDPN i la fluorescència de les diferents proteïnes estudiades es van analitzar amb el test de Duncan d'ANOVA i el nivell de significació α es va situar a $p < 0.05$.

5. RESULTATS

CAPÍTOL I

MODEL ANIMAL

5.1. Efecte de l'IDPN sobre el Pes Corporal dels animals

Per tal d'estudiar els processos involucrats en el dany i reparació vestibulars associats amb l'ototoxicitat crònica i la subsegüent recuperació, es van exposar rates Long Evans mascles a IDPN via l'aigua de beguda durant varies setmanes i es van avaluar al final del període d'exposició i al final d'un període de recuperació. Cada setmana es va portar a terme el control de pes i supervisió de totes les rates involucrades en els diferents experiments d'administració subcrònica amb IDPN en l'aigua de beguda. Està descrit que l'IDPN causa pèrdua de pes (Llorens & Rodríguez-Farré, 1997), motiu pel qual es va establir com a criteri d'eliminació dels animals de l'experiment, el fet que aquesta davallada fos superior al 25% durant dues pesades consecutives. Només una de les rates va haver de ser eliminada de l'estudi degut a l'excessiva pèrdua de pes corporal. Les rates van arribar a la Unitat d'Experimentació Animal del Campus de Bellvitge amb un pes de 225-249g, i passat el període de quarantena d'una setmana van assolir una mitjana de pes de 280g, moment en el qual es va realitzar el pre-test de disfunció vestibular de tots els animals i aquests es van distribuir a l'atzar en gàbies de 2-3 individus per tal de començar amb l'administració. Del total de 90 rates utilitzades: $n=24$ ho van ser com a controls (IDPN 0mM), $n=16$ van ser exposades a IDPN 10mM i $n=50$ a IDPN 20mM.

Els animals control van mostrar un augment de pes sostingut en el temps com es pot observar a la Fig. R1. En els individus amb administració subcrònica d'IDPN 10mM s'observava un increment progressiu de pes però inferior al dels controls, assolint una mitjana un 9% inferior als controls al final de les 10 setmanes d'exposició. En canvi, s'apreciava com els individus tractats amb IDPN 20mM durant les quatre primeres setmanes d'administració no mostraven increment de pes sinó que aquest es mantenia constant en el temps. Posteriorment, es va observar una petita pèrdua a les 5-6 setmanes de tractament, moment en el qual la seva disfunció vestibular assolía els valors màxims. Durant les següents setmanes van començar a tenir un augment de pes positiu respecte a temps 0. Al final de les 10 setmanes de tractament, el pes del grup 20mM era inferior en un 27% respecte als individus control i en un 20% respecte als animals administrats amb IDPN 10mM.

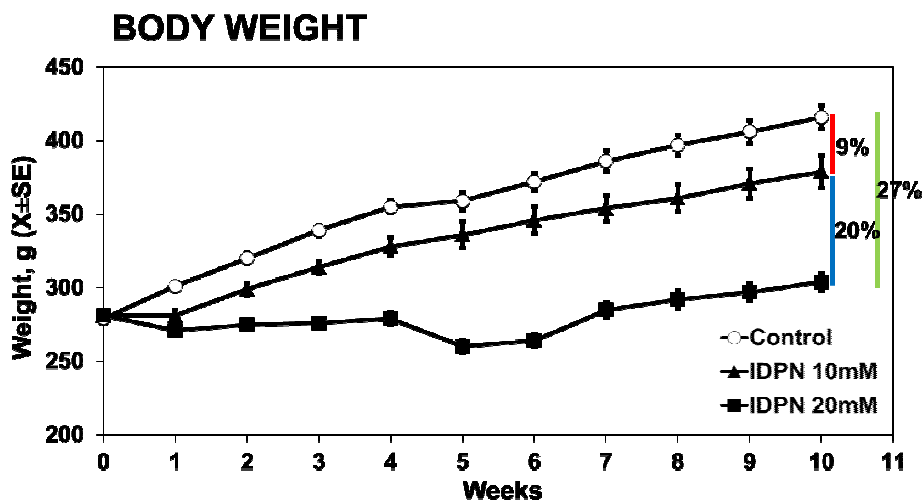


Figura R1. Efectes de l'administració d'IDPN subcrònic. Les barres mostren l'error estàndard respecte a la mitjana de pes quan aquestes són més grans que la mida del símbol. La ratlla vermella mostra la diferència de pes del grup IDPN 10mM respecte al grup control; la ratlla verda mostra la diferència del grup IDPN 20mM en relació al control; i la ratlla blava mostra la diferència entre el grup IDPN 10mM i el de 20mM.

5.2. Ingesta d'aigua i Dosi d'IDPN

Al llarg dels experiments es va calcular el volum d'ingesta de cada un dels grups (control, IDPN 10mM i IDPN 20mM) així com la dosi d'IDPN ingerida per les rates.

El volum d'ingesta calculat com a mL/rata*dia es mantenia força constant al llarg de les diferents setmanes de tractament en cada grup (Fig. R2). No obstant, s'observava que l'IDPN provocava una reducció concentració-depenent en el volum ingerit per les rates exposades al tòxic via l'aigua de beguda; el volum d'ingesta, respecte la ingesta dels controls (21mL/rata*dia, valor promig de tot l'experiment), es va veure disminuït en un 42% en el grup IDPN 10mM (12.26mL/rata*dia) i en un 55% en el grup IDPN 20mM (9.40mL/rata*dia) al llarg de les 10 setmanes. L'anàlisi d'ANOVA, seguit del test de Duncan, mostrava diferències significatives ($p < 0.05$) al llarg de les 10 setmanes entre el grup control i els grups IDPN 10 i 20mM.

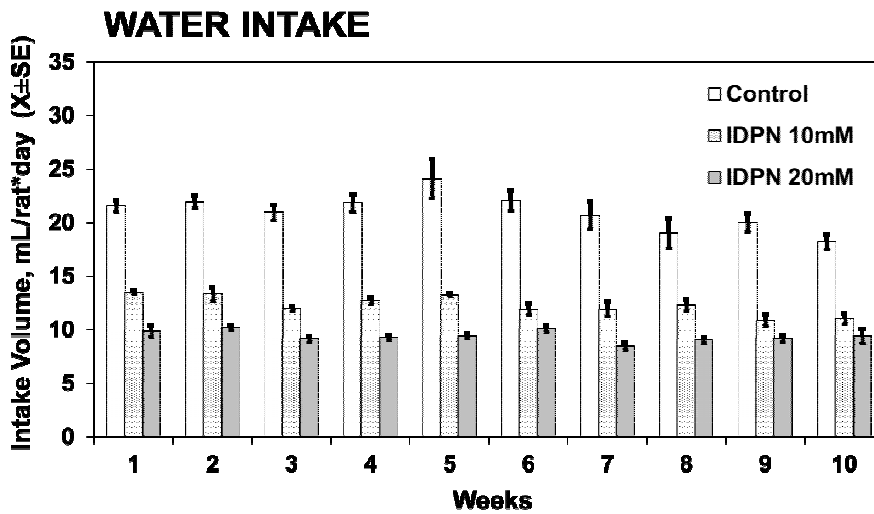


Figura R2. Ingesta d'aigua per les rates amb accés ad libitum a l'aigua de beguda amb concentracions d'IDPN 0mM (control), 10mM i 20mM.

D'acord amb dades prèvies (Llorens & Rodríguez-Farré, 1997), les rates administrades amb accés lliure a IDPN 10 o 20mM reben una dosi bastant estable d'aquest compost. La dosi d'IDPN ingerida calculada com a mmols/Kg*dia (Fig. R3.A) es mantenia més o menys constant en el temps en el grup d'IDPN 20mM mentre que es veia una disminució progressiva al llarg de les 10 setmanes de tractament en el grup IDPN 10mM. Això era degut a que com ja s'ha vist a la Fig. R1 el grup IDPN 20mM mantenia un pes constant al llarg de les 10 setmanes de tractament en canvi el grup IDPN 10mM mostrava un increment de pes, i aquest increment no es veia compensat amb un major increment del volum d'ingesta, la qual cosa feia que la dosi d'IDPN calculada com a mmols/Kg*dia disminuís. La dosi mitjana (Fig. R3.B) de les 10 setmanes de tractament pel grup de 20mM corresponia al 175% de la dosi ingerida pel grup de 10mM, de manera que l'increment en la dosi rebuda per les rates no era proporcional a l'increment en la concentració d'IDPN (Llorens & Rodríguez-Farré, 1997), és a dir, un increment en el doble de la concentració donava lloc a un increment inferior al doble en la dosi. No obstant, hi havia un increment efectiu en la ingesta d'IDPN.

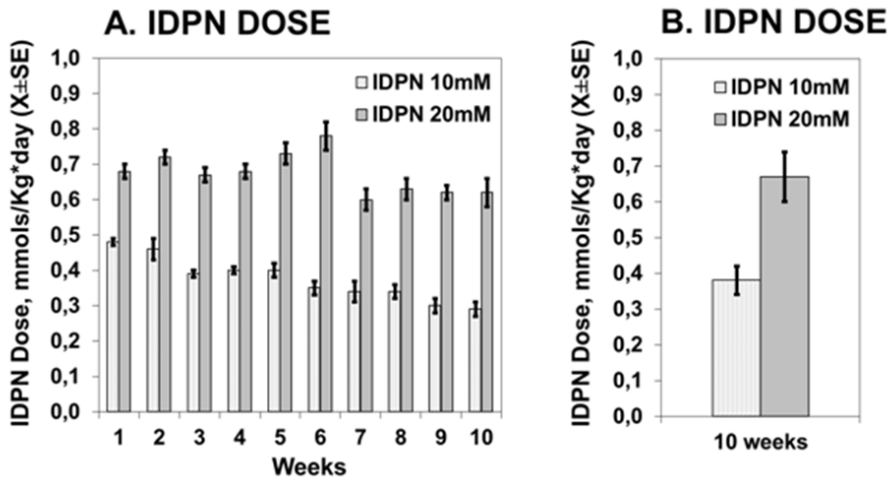


Figura R3. Dosi d'IDPN ingerida per les rates. **A.** Mitjana d'IDPN ingerit per les rates al llarg de les 10 setmanes de tractament (10mM i 20mM). **B.** Mitjana de la ingesta d'IDPN de les 10 setmanes.

5.3. Avaluació Comportamental de la Disfunció Vestibular causada per l'IDPN (VDR)

Estudis previs havien demostrat que exposicions a IDPN 20mM durant 13 setmanes causaven extrusió de les cèl·lules ciliades a les crestes i als utricles (Seoane *et al.*, 2001a) i que aquesta era precedida pel despreniment de les terminals aferents (Seoane *et al.*, 2001b). Aquestes rates no van mostrar una recuperació a nivell vestibular després de la fi de l'exposició, d'acord amb l'extensa pèrdua de cèl·lules ciliades observada a l'epiteli vestibular (Llorens & Rodríguez-Farré, 1997). Per altra banda, en diversos estudis experimentals no publicats es va observar una completa recuperació comportament si l'exposició s'aturava a les 4 setmanes.

Les dades d'avaluació de la disfunció vestibular s'analitzaren emprant un model MANOVA de mesures repetides. Aquesta anàlisi requeria que es tinguessin les dades de tots els individus en tots els punts de temps. Per això, de cada experiment es van fer dues anàlisis, una considerant només el període d'exposició que incloïa tots els animals

de l'estudi, i una altra considerant tot el temps d'experiment, és a dir, incloent els períodes d'exposició i de recuperació, que exclouia lògicament els animals matats per anàlisi histològica al final del període d'exposició, i que es va realitzar mitjançant el disseny de Greenhouse-Geiser de mesures repetides ANOVA.

Les rates exposades a IDPN 20mM a l'aigua de beguda durant 4 setmanes arribaven a puntuacions substancials però no màximes de disfunció vestibular (9-18 en una escala de 24). Quan s'interrompia l'exposició en aquest punt de temps tenia lloc una reducció progressiva de la disfunció vestibular i després de les 4 setmanes de descans només 1 dels 14 animals mostrava una puntuació substancial de 10, mentre que els altres 13 animals mostraven uns valors en el rang dels controls (0-2). Els efectes de l'administració d'IDPN 20mM, subcrònic durant 4 setmanes i 4 setmanes de recuperació, en la funció vestibular es mostren a la Fig. R4.A. L'anàlisi estadística del període d'exposició (4 setmanes IDPN 20mM) mostra que hi havia diferències significatives ($p < 0.05$) de la interacció tractament-setmana $-F(4,29)=27.2, p=0.000-$, de la setmana $-F(4,29)=34.9, p=0.000-$ i del tractament $-F(1,32)=105.4, p=0.000-$. L'anàlisi estadística de tot l'experiment (incloent els períodes d'exposició més 4 setmanes de recuperació) també mostrava diferències significatives de la interacció tractament-setmana $-F(8,10)=12.5, p=0.000-$, de la setmana $-F(8,10)=16.3, p=0.000-$ i del tractament $-F(1,17)=26.1, p=0.000-$. Es pot constatar que entre les setmanes 1 de tractament i la setmana 6 (corresponent a la setmana 2 de recuperació) hi havia diferències estadísticament significatives (*) entre el grup control i el grup tractat, la qual cosa indica que hi ha una recuperació completa de la disfunció vestibular al final del període de recuperació.

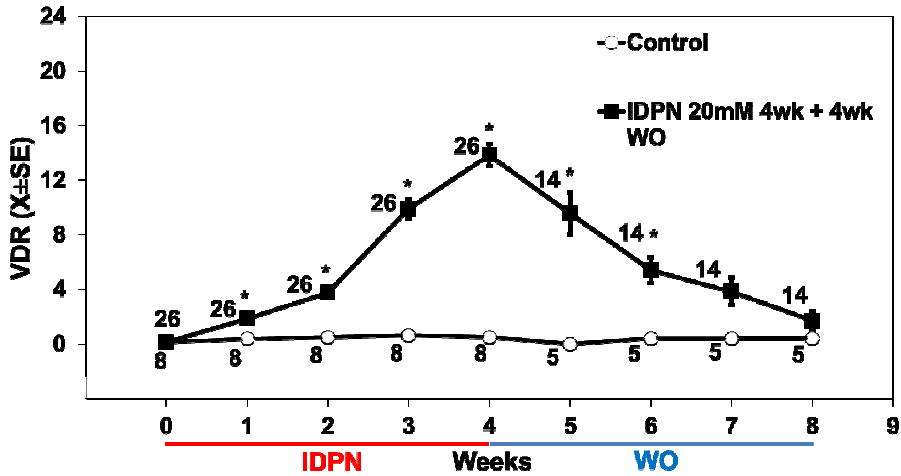
Per tal d'estudiar altres períodes d'administració que causessin un dany més profund, es va utilitzar un grup de rates addicionals que es van exposar a IDPN 20mM durant 6 setmanes. L'administració d'IDPN 20mM durant 6 setmanes (Fig. R4.B) també resultava en diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) pel que feia a la interacció tractament-setmana $-F(6,8)=75.1, p=0.000-$, a la setmana $-F(6,8)=70.9, p=0.000-$ i al tractament $-F(1,13)=122.3, p=0.000-$, quan s'anализava només el període d'exposició. L'anàlisi estadística de tot l'experiment (incloent els períodes

d'exposició i de recuperació) també mostrava diferències significatives de la interacció tractament-setmana $-F(1,857)=17.9, p=0.000-$, de la setmana $-F(1,857)=17.3, p=0.000-$ i del tractament $-F(1,7)=26.1, p=0.001-$. Degut al petit nombre d'animals deixats per anàlisi histològica fins a 18 setmanes, no es va fer la comparació estadística dels seus resultats de comportament. S'observa que entre les setmanes 2-6 de tractament i 7-9 de recuperació hi havia diferències estadísticament significatives (*) dels animals tractats respecte als control, que els animals estaven més afectats al final de l'exposició que en el cas anterior, i que al final del període de recuperació alguns animals seguien tenint una persistent disfunció vestibular, encara que degut a la reducció en el nombre d'animals la diferència entre grups no resultava estadísticament significativa.

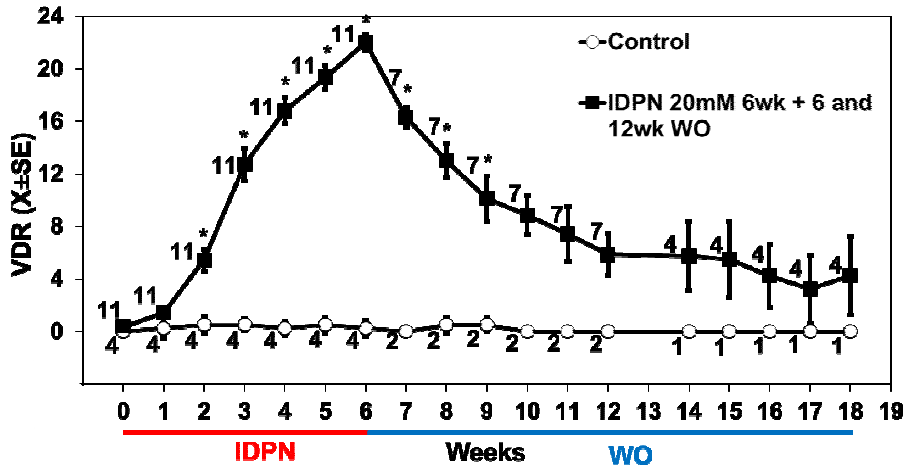
L'anàlisi estadística de l'exposició a IDPN 20mM durant 10 setmanes (Fig. R4.C) indicava que havia diferències significatives ($p<0.05$) pel període d'exposició de la interacció tractament-setmana $-F(20,32)=12.7, p=0.000-$, de la setmana $-F(10,16)=43.5, p=0.000-$ i del tractament $-F(1,25)=171.4, p=0.000-$. L'anàlisi estadística de tot l'experiment (incloent els períodes d'exposició i de recuperació) també mostrava diferències significatives de la interacció tractament-setmana $-F(6,594)=15.9, p=0.000-$, de la setmana $-F(3,297)=12.1, p=0.000-$ i del tractament $-F(1,13)=42.0, p=0.000-$. Aquests resultats indicaven que havia diferències significatives (*) entre les setmanes 1-10 de tractament i 11-16 de recuperació, però que no havia diferències significatives després de les 10 setmanes de recuperació tot i que s'apreciava una marcada disfunció vestibular deguda a l'elevada dispersió respecte al valor mig de la mostra, ja que havia animals que presentaven una recuperació completa mentre altres tenien una recuperació incompleta. A la dosi d'IDPN 10mM no s'apreciaven diferències estadísticament significatives en la disfunció vestibular al llarg de les 10 setmanes de tractament ni de les diferents setmanes de recuperació.

Entre les rates que es van deixar recuperar després de la fi de l'exposició en els tres experiments, totes les 12 rates amb valors de disfunció vestibular ≤ 17 al final del període d'exposició mostraven una recuperació completa de la disfunció vestibular (valors finals en el rang de 0 a 2), mentre que 6 de les 13 rates amb valors ≥ 18 (46%) mostraven una recuperació incompleta (valors finals >9).

**A. VESTIBULAR DYSFUNCTION RATINGS
IDPN 20mM 4wk AND 4wk WASH OUT**



**B. VESTIBULAR DYSFUNCTION RATINGS
IDPN 20mM 6wk AND 6 AND 12wk WASH OUT**



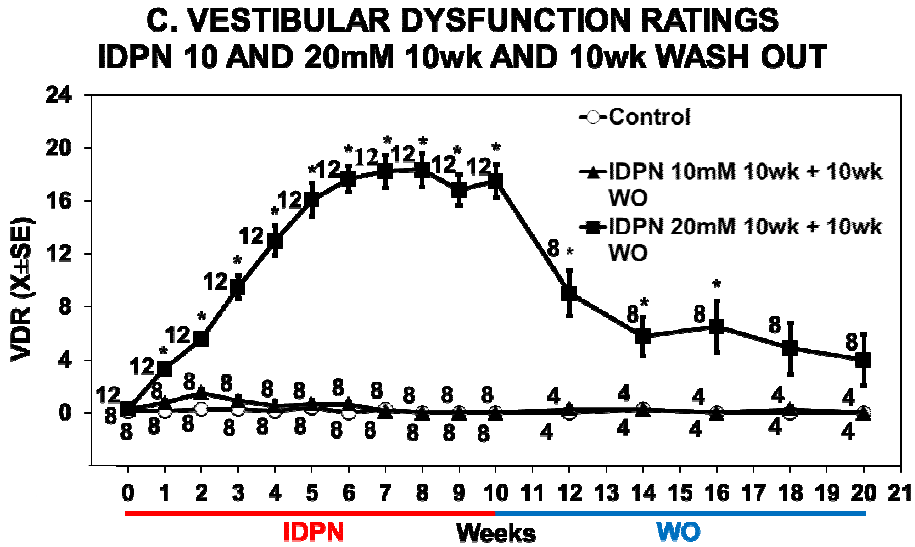


Figura R4. Efecte comportamental de l'IDPN subcrònic. Les barres mostren l'error estàndard respecte a la mitjana de disfunció vestibular quan aquestes són més grans que la mida del símbol. * Diferències significatives respecte a la mitjana control ($p < 0.05$). Sobre el gràfic s'ha representat el número d'animals per grup a cada una de les setmanes d'avaluació vestibular. En vermell el període d'administració amb IDPN 10 i/o 20mM a l'aigua de beguda i en blau el període de recuperació (WO, Wash-Out, període de recuperació). **A.** IDPN 20mM 4 setmanes tractament i 4 setmanes recuperació. **B.** IDPN 20mM 6 setmanes tractament i 6 i 12 setmanes recuperació. **C.** IDPN 10 i 20mM 10 setmanes tractament i 10 setmanes recuperació.

CAPÍTOL II

ULTRAESTRUCTURA

5.4. Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM)

Per tal d'identificar les etapes de dany que són susceptibles de reparació i que poden ser la base de la recuperació funcional, es van examinar les característiques ultraestructurals de les crestes i els utricles.

Les observacions histològiques a nivell ultraestructural dels epitelis sensorials vestibulars observats per microscòpia electrònica de rastreig (SEM) confirmaven que els espècimens control d'aquest estudi (Fig. R5) tenien les mateixes característiques morfològiques que es descriuen a la literatura per rates adultes normals (Hunter-Duvar & Hinojosa, 1984; Dechesne *et al.*, 1986; Llorens *et al.*, 1993) i per ratolins (Mbine & Sans, 1986), entre les que destaquen: feixos ciliars intactes emergint de la placa cuticular a la superfície apical de les cèl·lules ciliades i abundants microvellositats a la superfície apical de les cèl·lules de suport (Fig. R5.B,D).

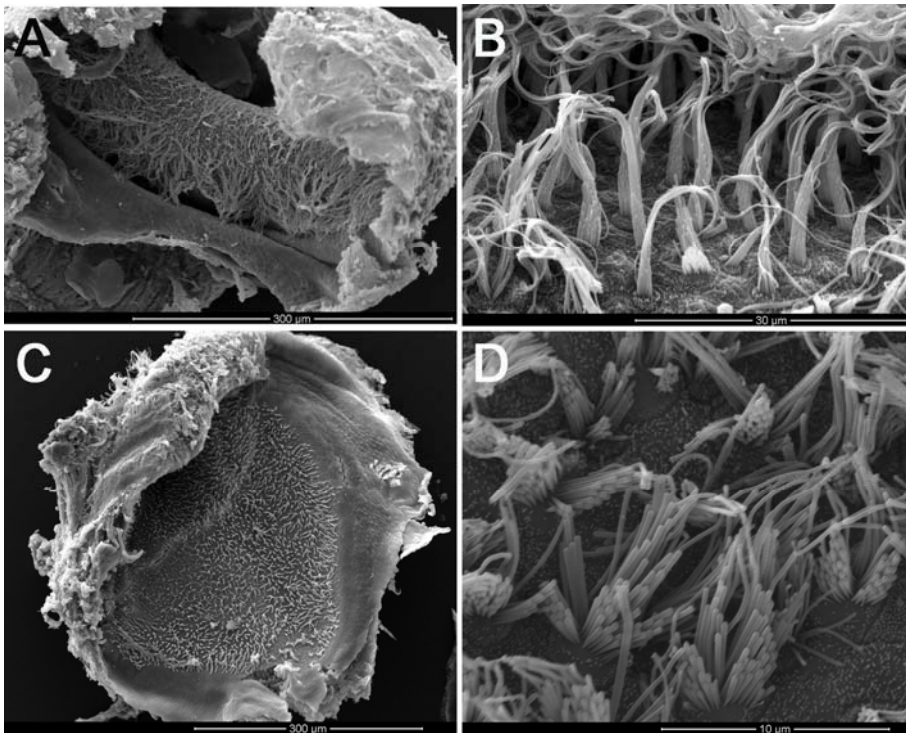


Figura R5. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) d'epitelis vestibulars d'animals control. **A.** Vista general cresta. **B.** Ampliació feixos ciliars intactes i microvellositats cèl·lules de suport

en cresta. **C.** Vista general utricles. **D.** Ampliació feixos ciliars intactes i microvellositats cèl·lules de suport en utricles.

La intoxicació crònica per IDPN provoca pèrdua de les cèl·lules ciliades per extrusió a diferència del que passa en la intoxicació aguda on s'observa necrosis o apoptosis de les cèl·lules ciliades (Seoane *et al.*, 2001a; Seoane & Llorens, 2005). L'extrusió de les cèl·lules ciliades té lloc en crestes i utricles (Seoane *et al.*, 2001a) però no s'observa en sàculs, els quals tenen un comportament diferent.

5.4.1. SEM: Efecte de l'IDPN 20mM, 4 setmanes d'exposició

La majoria de rates administrades amb IDPN 20mM durant 4 setmanes, després de l'exposició crònica no mostraven evidències d'anormalitats ciliars (Fig. R6.A-B) a nivell de cresta, sinó una morfologia comparable amb els controls (Fig. R5.A-B) als quals s'observaven feixos d'estereocilis normals, i només en un animal amb molta afectació a nivell comportamental ($VDR \geq 18$) es va observar un inici d'extrusió (Fig. R6.D) amb presència de poques cèl·lules ciliades amb els cilis en coalescència, tot i que en algun animal amb valor de disfunció vestibular ≤ 17 es van observar alguns feixos de cilis enganxats (Fig. R6.C). Després del període de 4 setmanes de recuperació, durant el qual els animals van rebre aigua de beguda sense tòxic, es va observar que els individus administrats prèviament amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (Fig. R6.E) presentaven una aparença normal dels feixos ciliars. No obstant, hi va haver un individu que passat el període de recuperació no mostrava una recuperació vestibular completa, presentant un disfunció vestibular de 10, i a nivell ultraestructural (Fig. R6.F) presentava algunes cèl·lules ciliades en extrusió, així com absència de feixos ciliars que indicaven pèrdua de cèl·lules.

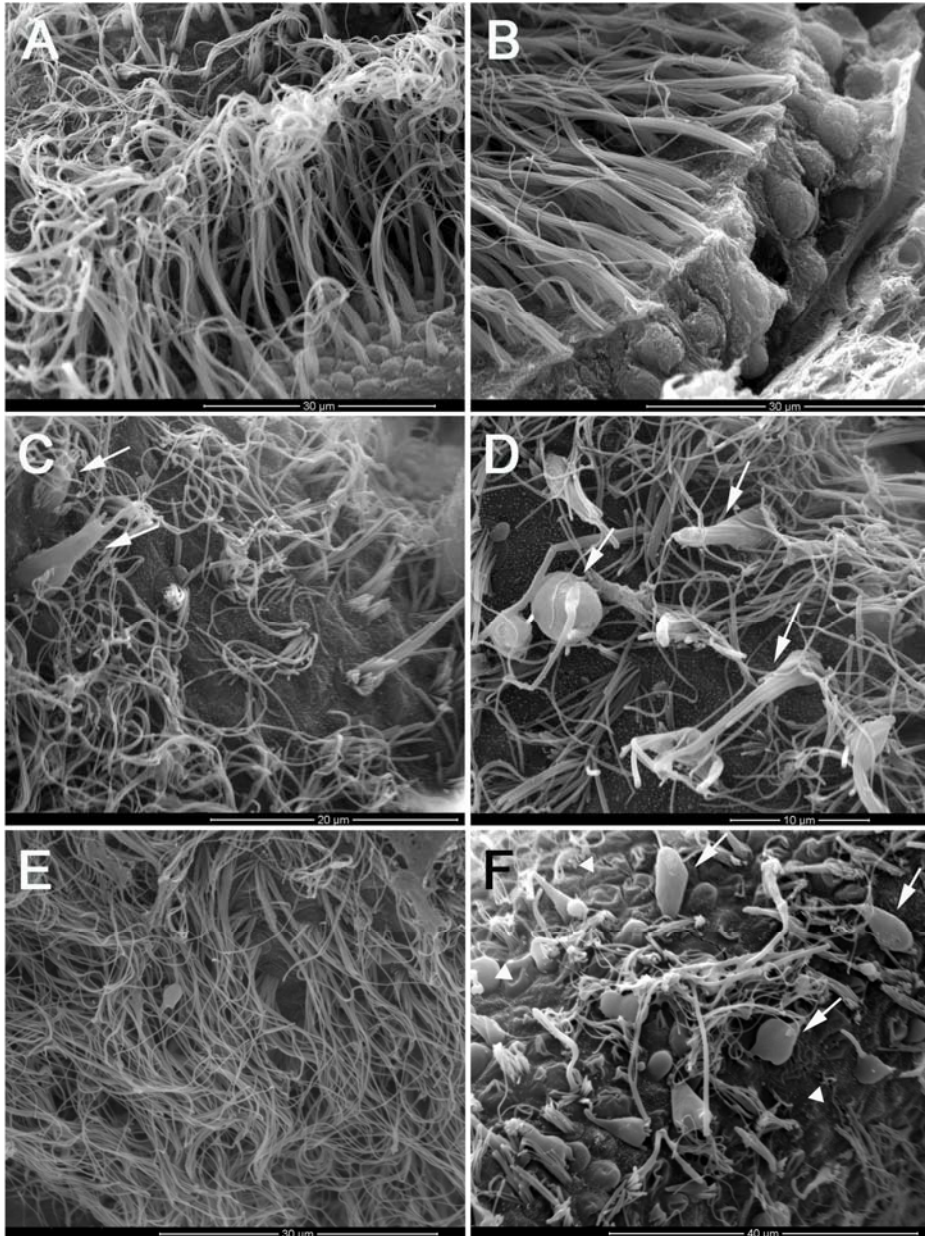


Figura R6. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) de crestes ampul·lars d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 4 setmanes, estudiats immediatament o després d'un posterior període de recuperació. Les fletxes blanques assenyalen les cèl·lules ciliades en extrusió. Els caps de fletxa blancs marquen la pèrdua de cèl·lules ciliades. **A-C.** Crestes tractades 4 setmanes amb IDPN que presenten una disfunció vestibular (VDR) inferior o igual a 17: **A.** VDR=7, **B.** Fractura de cresta amb VDR=11, on es poden apreciar les cèl·lules

ciliades sensorials i els feixos ciliars intactes, i C. VDR=15. D. Cresta tractada 4 setmanes amb IDPN que presenta una disfunció vestibular superior o igual a 18 amb VDR=23. E. Cresta obtinguda després del període de recuperació de 4 setmanes i que presenta una recuperació completa de la funció vestibular, VDR=0, quan a les 4 setmanes de tractament presentava una VDR=14. F. Cresta obtinguda després del període de recuperació de 4 setmanes amb una persistent disfunció vestibular, VDR=10, al final del període d'exposició mostrava VDR=18.

Pel que fa als utricles dels individus sotmesos a exposició crònica d'IDPN 20mM al llarg de 4 setmanes, es va observar que aquests estaven afectats de manera similar a les crestes, mostrant presència de feixos ciliars coalescents en els individus amb major disfunció vestibular. En els utricles control, igual que en les crestes control, es va constatar presència d'estereocilis normals (Fig. R5.C-D). Observant els utricles es va poder reafirmar que l'extrusió ciliar correlacionava amb el grau de disfunció vestibular, ja que quan aquesta era inferior o igual a 17 (Fig. R7.A-B) no s'observava presència de cilis coalescents, mentre que si aquesta disfunció vestibular era igual o superior a 18 (Fig. R7.C-D) es començaven a observar cèl·lules ciliades vestibulars amb els cilis en coalescència. Després del període de recuperació, en els espècimens amb recuperació completa de la disfunció vestibular, no s'observaven cèl·lules ciliades en extrusió (Fig. R7.E). L'utricle de l'individu que al final del període de recuperació de 4 setmanes no mostrava recuperació de la disfunció vestibular, sent aquesta de 10 (Fig. R7.F), presentava presència de cilis coalescents així com de cèl·lules ciliades extrusionades, marcat per l'englobament dels cilis pel citoplasma. Hi havia alguns utricles que mostraven butllofes darrere de feixos ciliars amb els cilis en perfecte estat, aquestes butllofes probablement eren indicatiu de l'existència d'estrès cel·lular, el qual no es podia atribuir de manera inequívoca a la toxicitat ja que també s'observava en els epitelis d'individus amb recuperació, podien ser artefactes generats durant la fixació i dissecció dels epitelis.

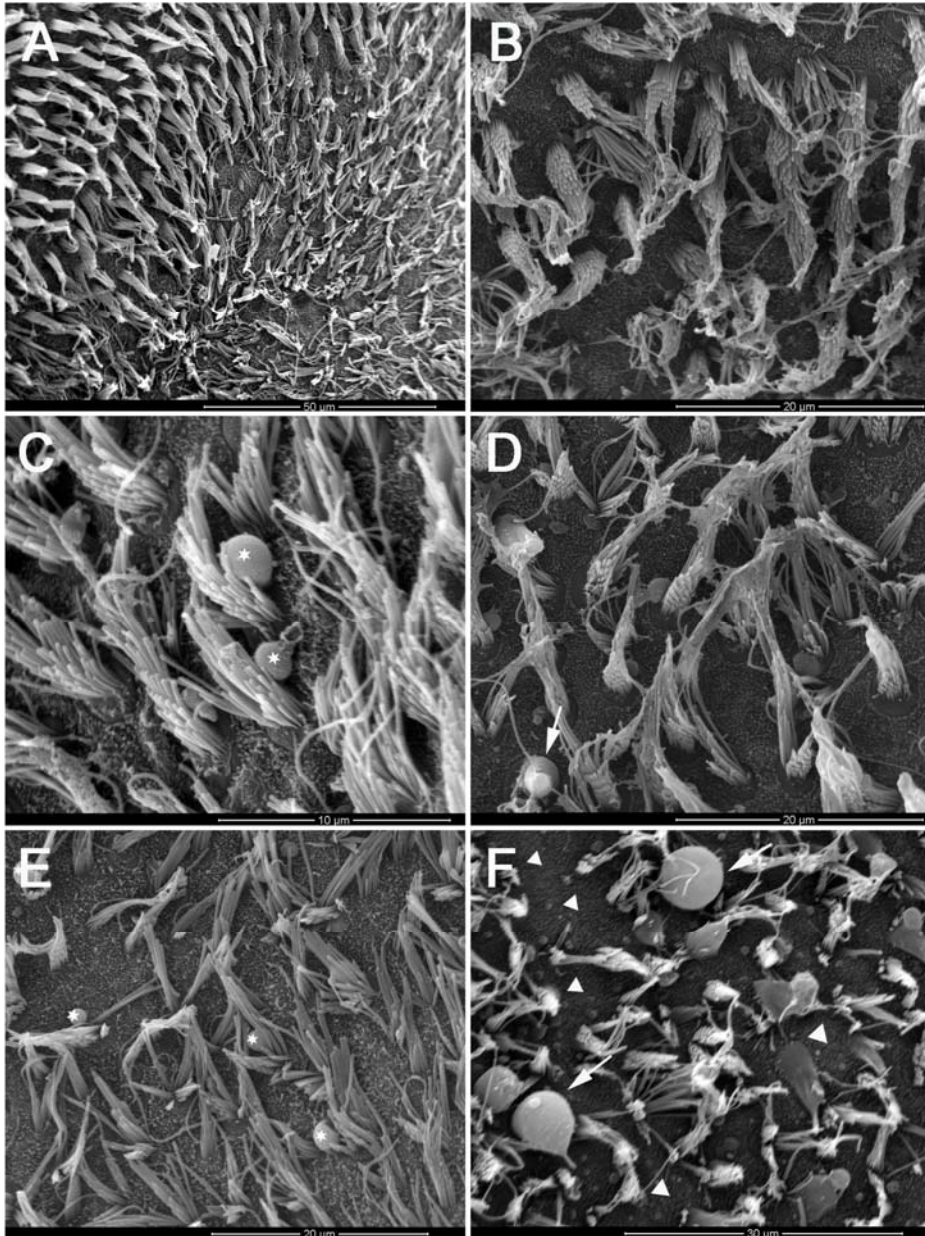


Figura R7. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) d'utracles d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 4 setmanes, estudiats immediatament o després d'un posterior període de recuperació. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules ciliades en extrusió. Els caps de fletxa blancs marquen la pèrdua de cèl·lules ciliades. Els asteriscs blancs indiquen butllofes. **A-B.** Utricles tractats 4 setmanes amb IDPN que presenten una disfunció vestibular inferior o igual a 17: **A.** VDR=8 i **B.** VDR=12. **C-D.** Utricles tractats 4 setmanes amb IDPN

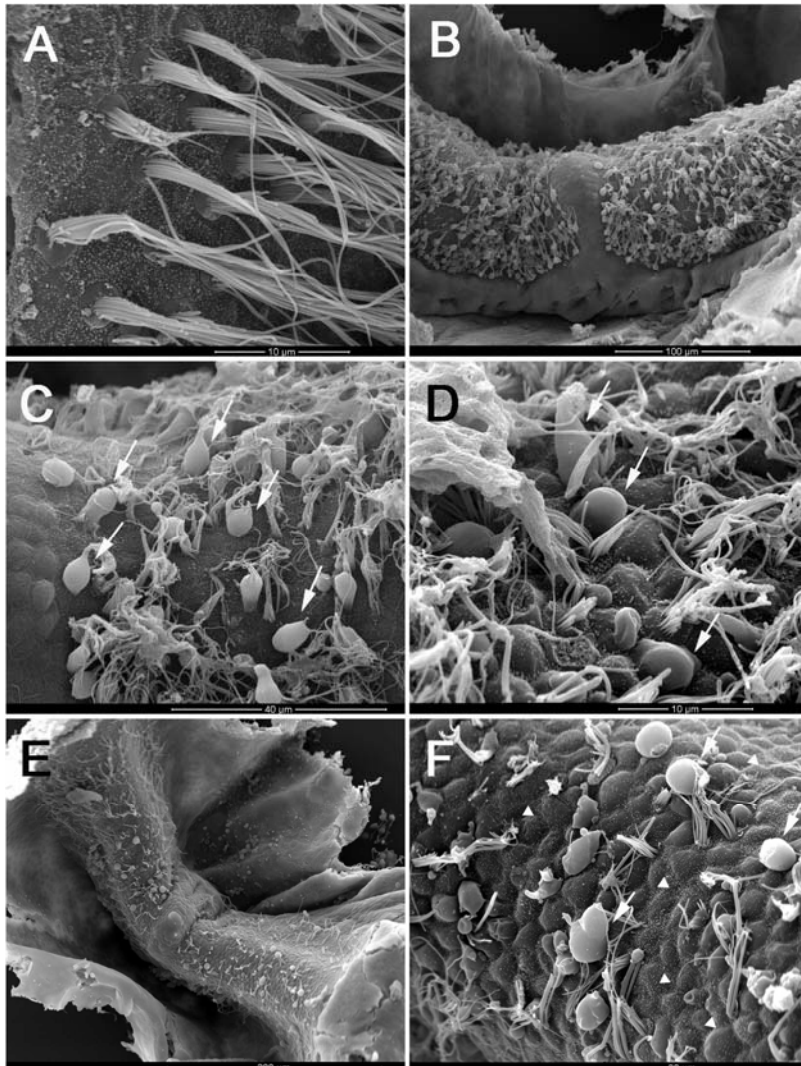
que presenten una disfunció vestibular superior o igual a 18: **C.** VDR=18 i **D.** VDR=23. **E.** Utriclle obtingut després del període de recuperació de 4 setmanes i que presenta una recuperació completa de la funció vestibular, VDR=2, quan a les 4 setmanes de tractament presentava VDR=15. **F.** Utriclle obtingut després del període de recuperació de 4 setmanes amb una persistent disfunció vestibular, VDR=10, al final del període d'exposició mostrava VDR=18.

Els sàculs no s'han observat de manera sistemàtica, però en estudis previs amb antibiòtics s'ha pogut constatar que són més resistents que les crestes i els utricles (Aran *et al.*, 1982; Sera *et al.*, 1987; Takumida *et al.*, 1989) així com a les intoxicacions cròniques amb IDPN (Seoane *et al.*, 2001a), ja que no s'observava presència de feixos ciliars en coalescència.

5.4.2. SEM: Efecte de l'IDPN 20mM, 6 setmanes d'exposició

A les 6 setmanes de tractament amb IDPN 20mM, tots els individus mostraven una disfunció vestibular igual o superior a 18. La majoria d'individus presentaven molt poques cèl·lules ciliades amb els cilis en coalescència (Fig. R8.A), tot i que hi havia un individu que a les 6 setmanes mostrava un gran nombre de cèl·lules ciliades en fase avançada d'extrusió (Fig. R8.B-C); es va poder constatar que aquest animal era l'únic que a les 4 setmanes de tractament havia mostrat una disfunció vestibular superior o igual a 18, sent aquesta de VDR=22, mentre que la resta d'individus havien mostrat una disfunció vestibular inferior o igual a 17. Al llarg dels diferents temps d'administració es va poder veure que tots els epitelis observats dels individus control eren equivalents, tant pel que feia a les crestes (Fig. R5 A-B) com als utricles (Fig. R5 C-D). Es va poder observar que a major període d'exposició hi havia una menor probabilitat de recuperació total de la disfunció vestibular passat el període de recuperació, ja que hi havia un major nombre d'animals que no presentaven una completa recuperació; després del període de recuperació de 6 setmanes posterior a les 6 setmanes d'administració d'IDPN 20mM, es va veure que hi havia dos rates que seguien tenint una persistent disfunció vestibular (Fig. R8.E-F). Aquests animals a més a més de

presentar coalescència dels feixos de cilis també mostraven pèrdua de les cèl·lules ciliades vestibulars, mentre que la resta d'animals mostraven una gairebé completa recuperació de la disfunció vestibular (Fig. R8.D) i s'observava presència d'alguns cilis coalescents; si s'allargava el període de recuperació a 12 setmanes s'observava que hi havia una major recuperació de la disfunció vestibular amb una menor presència de feixos ciliars coalescents (Fig. R8.G), tot i que seguia havent-hi un individu que no mostrava recuperació completa de la disfunció vestibular, sent aquesta de 13 al final de les 12 setmanes de recuperació (Fig. R8.H), el qual mostrava una major absència de cèl·lules ciliades.



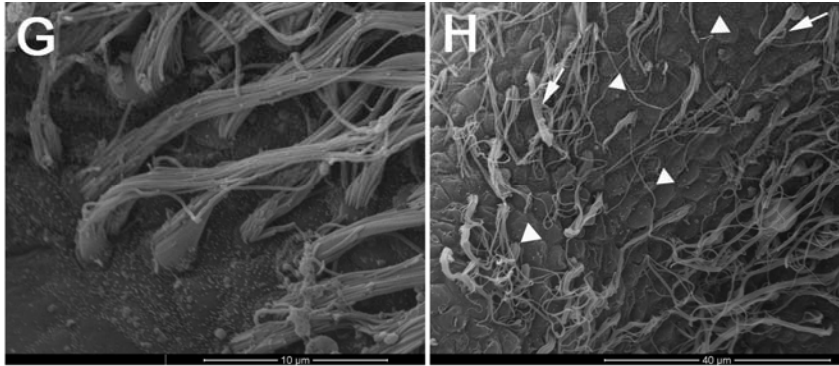
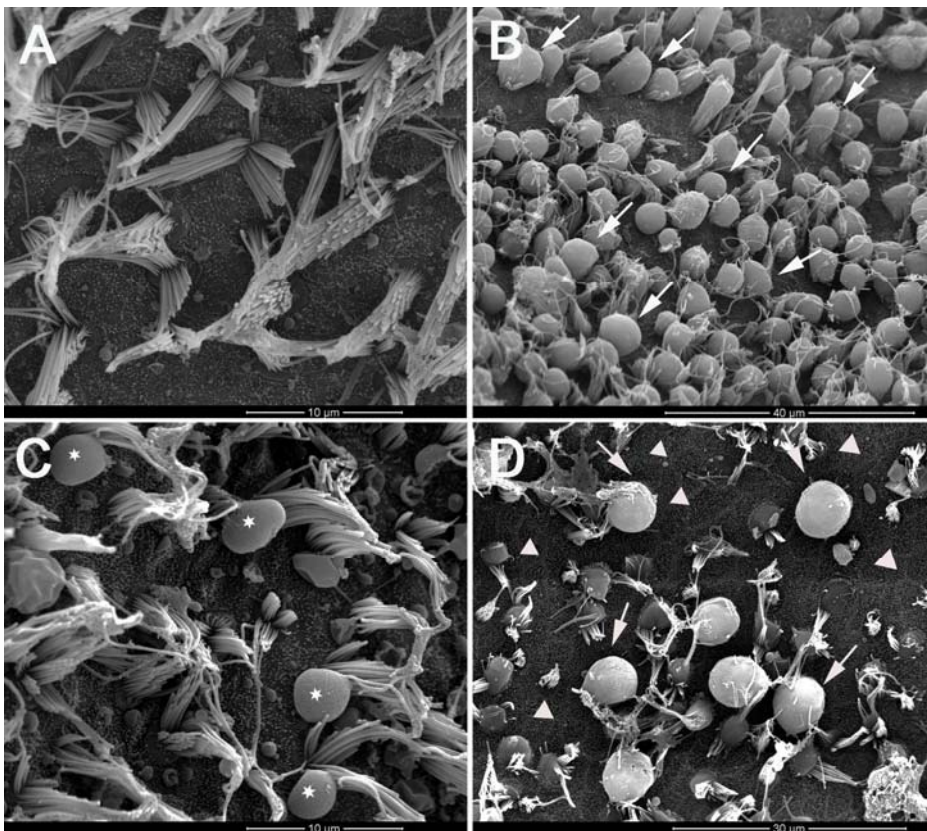


Figura R8. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) de crestes d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 6 setmanes, estudiats immediatament o després de diferents períodes de recuperació posteriors. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules ciliades en extrusió. Els caps de fletxa blancs marquen la pèrdua de cèl·lules ciliades. **A-C.** Crestes tractades 6 setmanes amb IDPN amb disfunció vestibular superior a 18: **A.** VDR=19, **B-C.** VDR=24. **D.** Cresta obtinguda després del període de recuperació de 6 setmanes i que presenta una recuperació gairebé completa de la funció vestibular, VDR=3, quan a les 6 setmanes de tractament mostrava VDR=24. **E-F.** Cresta obtinguda després del període de recuperació de 6 setmanes sense recuperació completa de la funció vestibular, VDR=14, quan a les 6 setmanes d'exposició presentava VDR=24. **G.** Cresta obtinguda després del període de recuperació de 12 setmanes amb recuperació vestibular gairebé completa, VDR=3, quan a les 6 setmanes d'administració presentava VDR=23. **H.** Cresta obtinguda després del període de recuperació de 12 setmanes amb persistent disfunció vestibular de 13, a les 6 setmanes de tractament mostrava VDR=24.

En el cas dels utricles les observacions realitzades ens reafirmen l'observat en les crestes després del període de tractament de 6 setmanes i posterior recuperació de 6 o 12 setmanes. Els controls presentaven els feixos ciliars intactes i abundants microvellositats a la superfície apical de les cèl·lules de suport (Fig. R5.C-D), tal com es va poder apreciar al llarg dels diferents experiments. A les 6 setmanes de tractament amb IDPN 20mM, s'advertien poques cèl·lules ciliades amb els cilis coalescents (Fig. R9.A), excepte en un individu que a les 4 setmanes presentava VDR=22, el qual mostrava nombroses cèl·lules amb els feixos ciliars coalescents en fase avançada d'extrusió (Fig. R9.B). Es va constatar que a major període d'exposició hi havia una menor probabilitat de recuperació total de la disfunció vestibular passat el període de

recuperació; després de les 6 setmanes de recuperació i amb una completa recuperació de la disfunció vestibular (Fig. R9.C) no s'observava presència de cilis en coalescència, mentre que si persistia la disfunció vestibular a més a més de cilis coalescents s'observava absència de cèl·lules ciliades (Fig. R9.D) la qual cosa confirmava la seva extrusió; quan el període de recuperació s'allargava a 12 setmanes s'observa una baixa presència de feixos ciliars en coalescència (Fig. R9.E) en els individus que presentaven recuperació de la disfunció vestibular, mentre que en els individus que seguien amb una persistent disfunció s'observava una menor presència de feixos ciliars en coalescència però una major evidència de pèrdua de cèl·lules (Fig. R9.F).



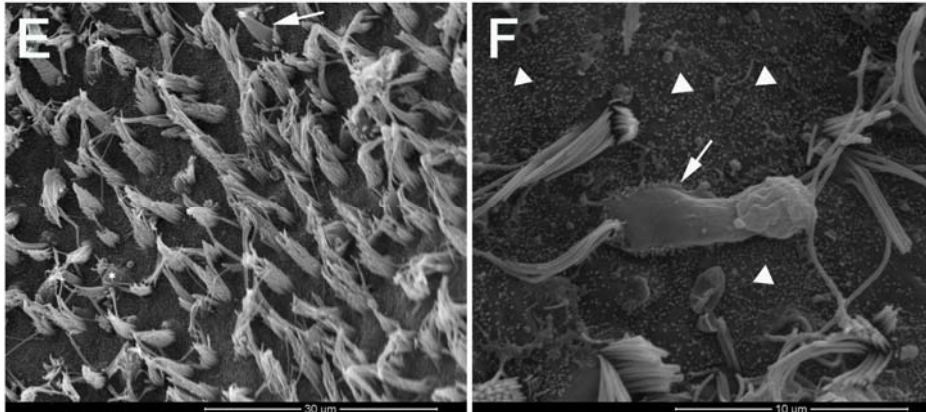
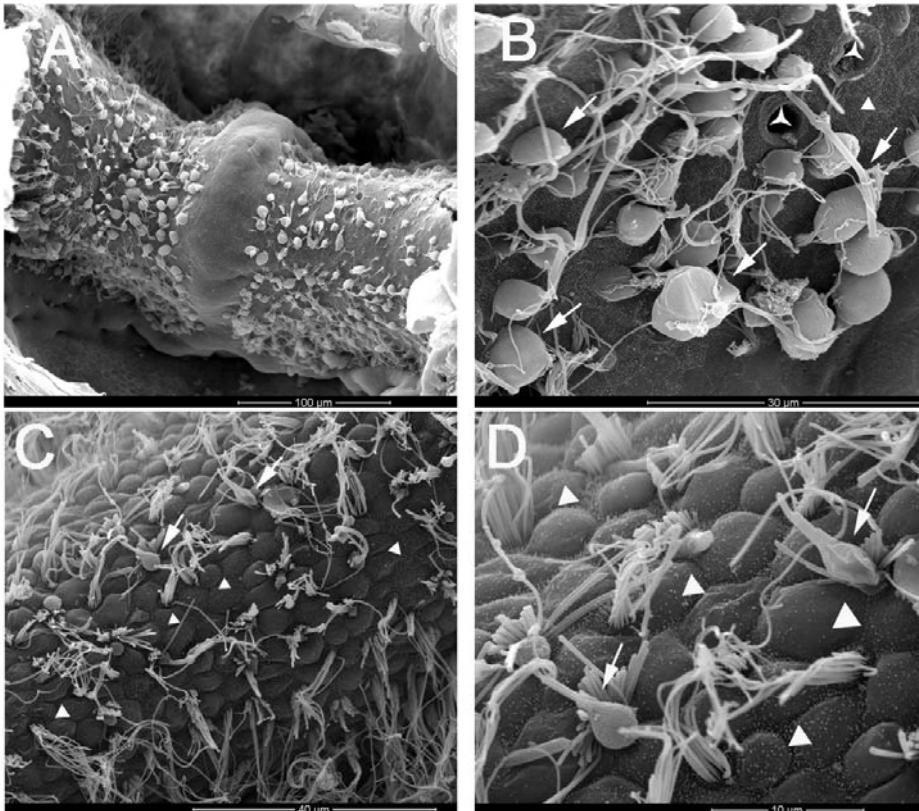


Figura R9. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) d'utricles d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 6 setmanes, estudiats immediatament o després de diferents períodes de recuperació posteriors. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules ciliades en extrusió. Els caps de fletxa blancs marquen la pèrdua de cèl·lules ciliades. Els asteriscs blancs indiquen butllofes. En cas que hagi molts cilis amb coalescències o absència de cèl·lules ciliades només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. **A-B.** Utricles tractats 6 setmanes amb IDPN amb disfunció vestibular superior a 18: **A.** VDR=23 i **B.** VDR=24. **C.** Utricle obtingut després del període de recuperació de 6 setmanes i que presenta una recuperació gairebé completa de la funció vestibular, VDR=3, a les 6 setmanes d'administració presentava VDR=24. **D.** Utricle obtingut després del període de recuperació de 6 setmanes sense recuperació completa de la funció vestibular, VDR=14, a les 6 setmanes de tractament la disfunció vestibular era de 24. **E.** Utricle obtingut després del període de recuperació de 12 setmanes amb recuperació vestibular completa, VDR=0, a les 6 setmanes de tractament presentava VDR=20. **F.** Utricle obtingut després del període de recuperació de 12 setmanes amb persistent disfunció vestibular de 13, a les 6 setmanes d'administració presentava VDR=24.

5.4.3. SEM: Efecte de l'IDPN 20mM, 10 setmanes d'exposició

A nivell d'observacions realitzades en cresta, els individus control presentaven el mateix patró descrit que a la resta d'experiments (Fig. R5.A-B). Amb administracions perllongades d'IDPN 20mM (10 setmanes) s'observava una major presència de cèl·lules ciliades en extrusió (Fig. R10.A-B), i de manera paral·lela apareixen evidències de l'absència de cilis en llocs de l'epiteli que n'haurien de mostrar, indicant l'absència de

la cèl·lula corresponent. A mesura que s'incrementava el període d'administració, encara que s'incrementés el període de recuperació, seguia havent-hi individus que no mostraven una recuperació completa de la disfunció vestibular al final del període de recuperació, el que tornava a evidenciar que a major període d'exposició menor probabilitat de recuperació. A les 10 setmanes de recuperació, en rates que havien tingut una completa o gairebé completa recuperació de la funció vestibular (Fig. R10.C-D) se seguia observant presència de coalescència ciliar així com absència de feixos cilials indicatiu de falta de cèl·lules ciliades per extrusió; però només dos individus van mostrar recuperació vestibular incompleta, i es va poder observar en zona central que la proporció de cèl·lules ciliades perdudes era major (Fig. R10.E). No obstant, l'epiteli mostrava forats, els quals molt probablement corresponen a cèl·lules ciliades en fase avançada d'extrusió que s'han arrancat durant la dissecció i manipulació dels epitelis. Totes aquestes observacions són indicatives d'una lesió més extensa.



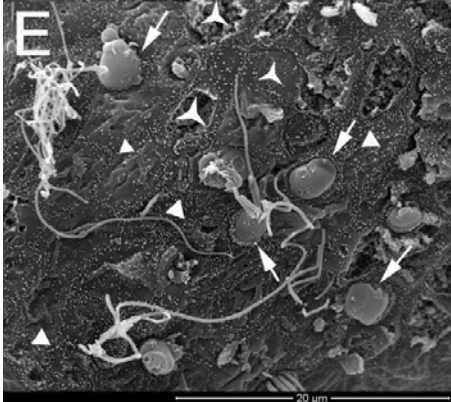


Figura R10. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) de crestes d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 10 setmanes, estudiats immediatament o després d'un posterior període de recuperació de 10 setmanes. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules ciliades en extrusió. Els caps de fletxa blancs marquen la pèrdua de cèl·lules ciliades. Les estrelles de tres puntes blanques indiquen manca de cèl·lules ciliades molt extrusionades que s'han arrencat amb la cúpula durant la preparació de l'epiteli. En cas que hagi molts cilis amb coalescències o absència de cèl·lules ciliades només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. **A-B.** Cresta tractada 10 setmanes amb IDPN amb VDR=24. **C-D.** Cresta obtinguda després del període de recuperació de 10 setmanes i que presenta una recuperació gairebé completa de la funció vestibular, VDR=2. **E.** Cresta obtinguda després del període de recuperació de 10 setmanes sense recuperació completa de la funció vestibular, VDR=15.

En observacions realitzades en utricles es va constatar exactament el mateix que en les crestes. Correcta presència en els controls de feixos ciliars i de microvellositats (Fig. R5.C-D) al llarg de tots els experiments. En les rates tractades durant 10 setmanes amb IDPN 20mM es va poder apreciar gran presència de coalescència ciliar així com manca de feixos ciliars indicant la pèrdua de cèl·lules ciliades vestibulars (Fig. R11.A-B). Pel que fa a recuperació de la disfunció vestibular, tots els individus menys dos van tenir una recuperació completa de la disfunció vestibular després de les 10 setmanes de descans. Tots els individus que van recuperar la funció vestibular (Fig. R11.C-D) mostraven una menor presència de feixos ciliars enganxats, en comparació a les 10 setmanes de tractament, així com falta de cèl·lules ciliades marcat per l'absència de feixos ciliars. No obstant, els dos individus que no tenien recuperació completa de la

disfunció vestibular (Fig. R11.E-F) mostraven una major presència de cèl·lules ciliades en fase avançada d'extrusió.

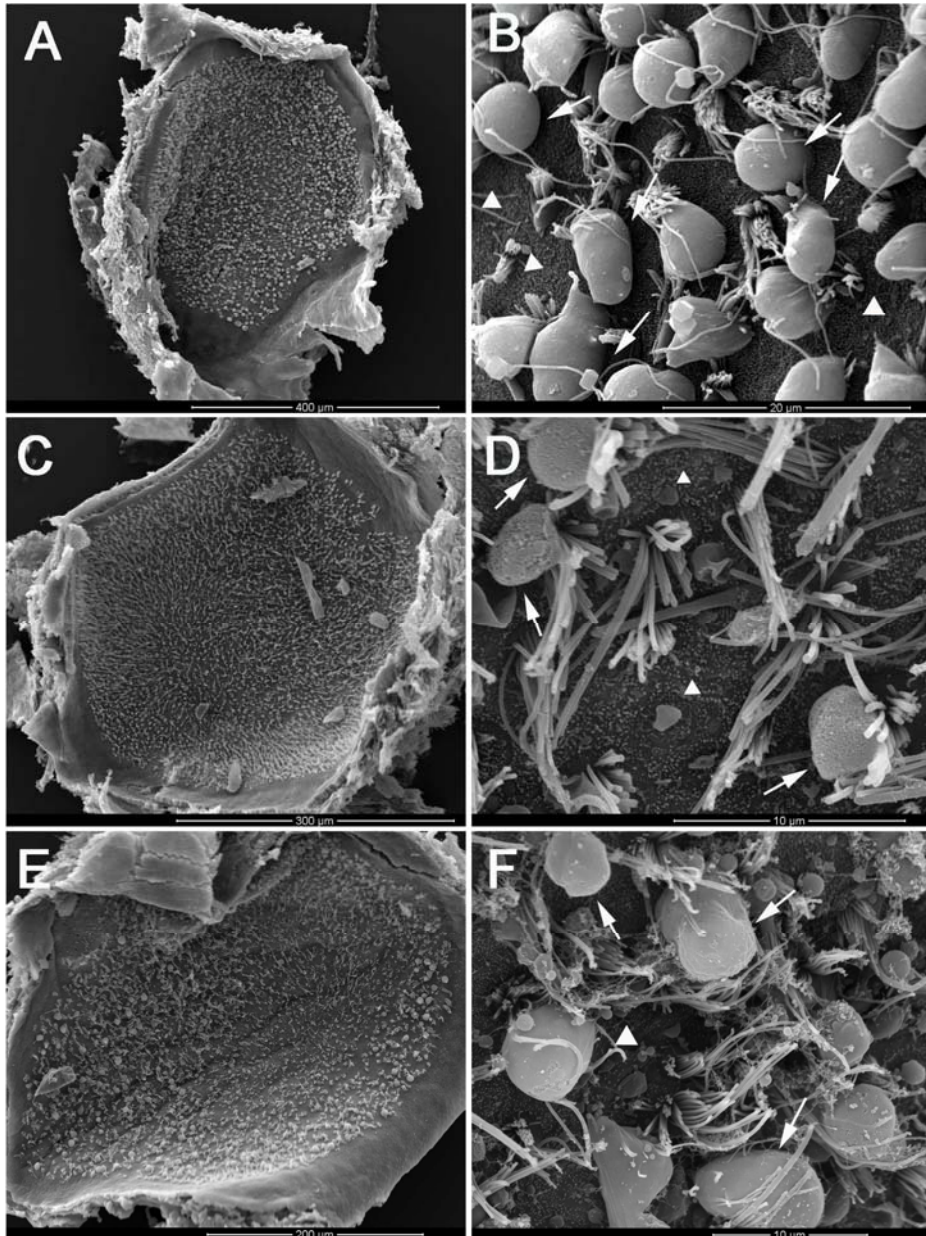


Figura R11. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) d'utricles d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 10 setmanes, estudiats immediatament o després d'un posterior període de recuperació de 10 setmanes. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules

ciliades en extrusió. Els caps de fletxa blancs marquen la pèrdua de cèl·lules ciliades. En cas que hagi molts cilis amb coalescències o absència de cèl·lules ciliades només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. A-B. Utricle tractat 10 setmanes amb IDPN, VDR=24. C-D. Utricle obtingut després del període de recuperació de 10 setmanes i que presenta una recuperació gairebé completa de la funció vestibular, VDR=2. E-F. Utricle obtingut després del període de recuperació de 10 setmanes sense recuperació completa de la funció vestibular, VDR=15.

Totes aquestes observacions suggereixen que durant l'estrès ototòxic crònic té lloc una significant disfunció vestibular prèvia a la coalescència dels cilis, i que la pèrdua funcional està oberta a una recuperació substancial. L'aparició de la coalescència ciliar i l'extrusió de les cèl·lules ciliades està associada amb una menor oportunitat de recuperació de la disfunció vestibular.

5.4.4. SEM: Efecte de l'IDPN 10mM, 10 setmanes d'exposició

Per tal de constatar la relació entre el grau de disfunció vestibular i la coalescència ciliar amb la consegüent pèrdua de les cèl·lules ciliades per extrusió es va portar a terme l'exposició a IDPN 10mM durant 10 setmanes. En el Capítol I s'ha mostrat que a les 10 setmanes de tractament amb concentració 10mM d'IDPN els diferents individus no mostraven disfunció vestibular. A nivell de SEM s'ha pogut observar que tampoc tenien lloc canvis en la morfologia ciliar de les cèl·lules ciliades vestibulars al llarg dels diferents temps de tractament: 4 (Fig. R12.A-B) o 10 setmanes d'IDPN 10mM (Fig. R12.C-D) i 10 setmanes IDPN 10mM seguides de 10 setmanes de recuperació (Fig. R12.E-F) pel que fa a les crestes. En els controls les observacions són equivalents a la resta d'experiments (Fig. R5.A-B).

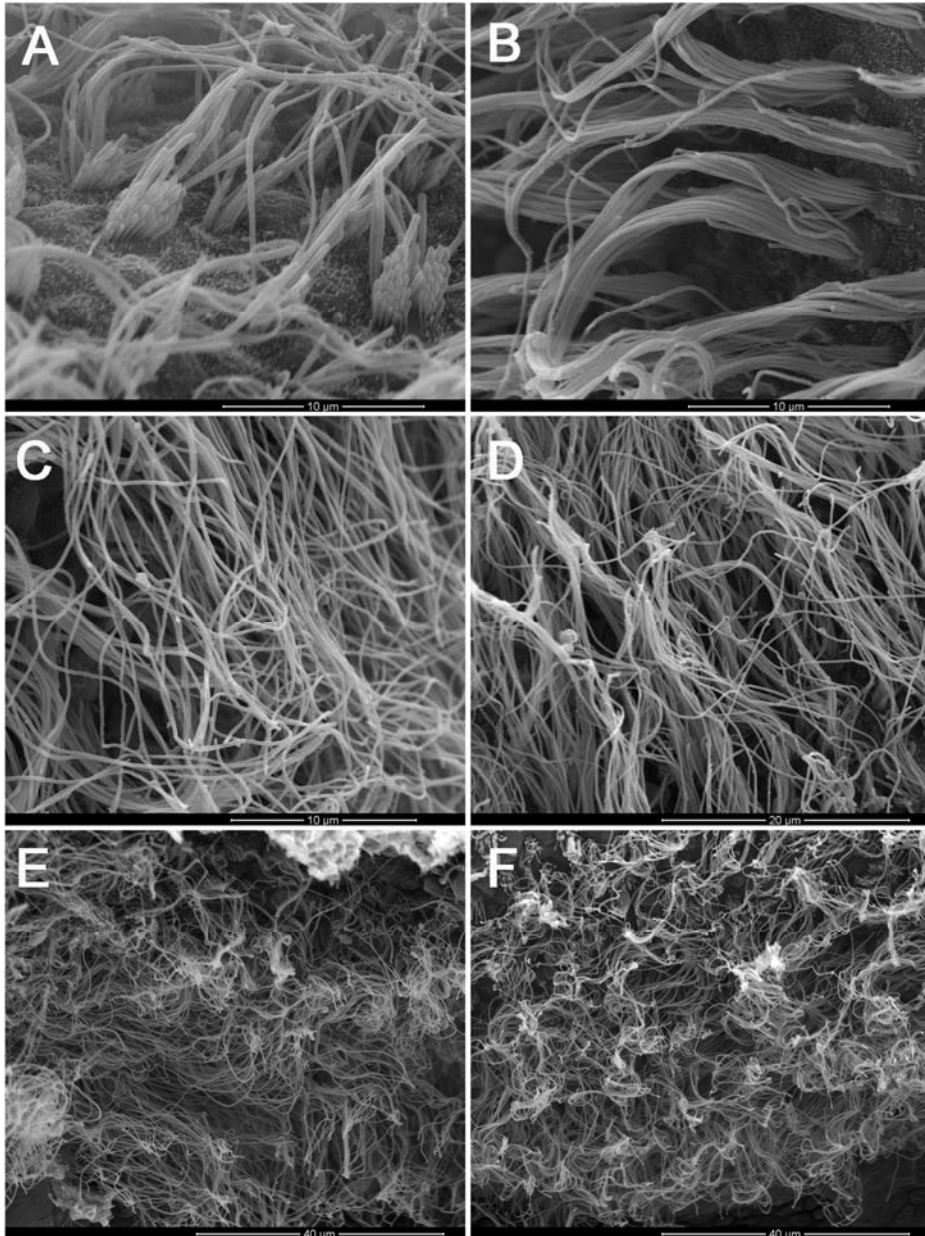
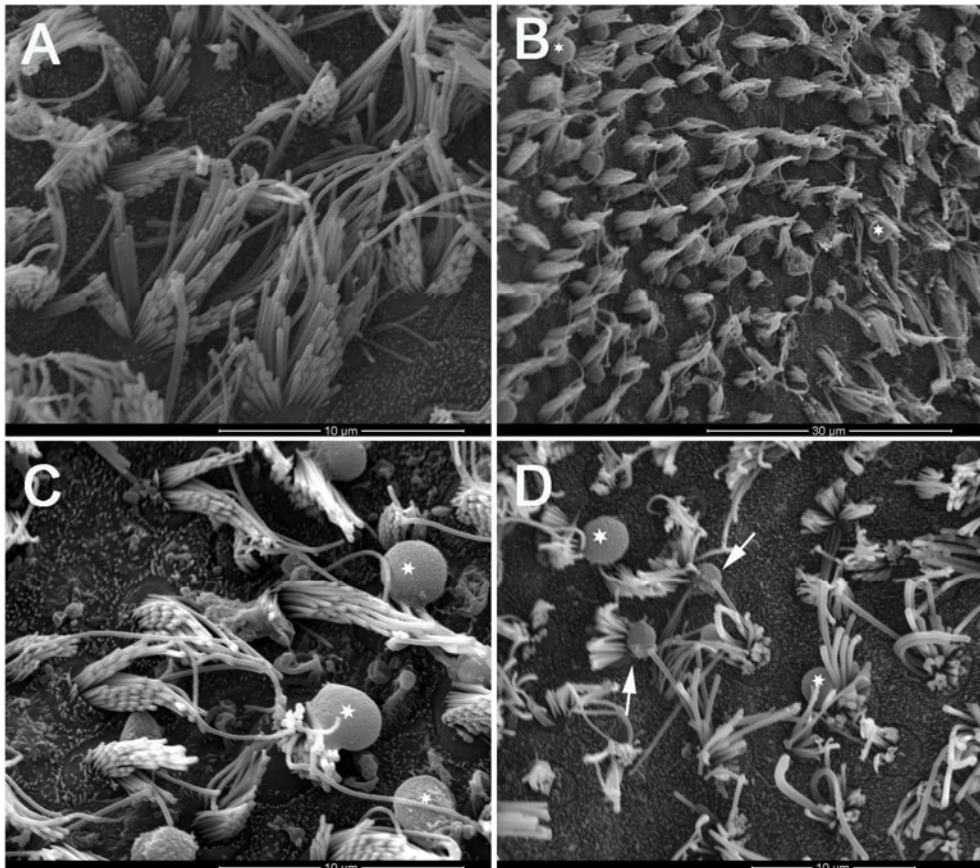


Figura R12. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) de crestes d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 10mM durant 4 i 10 setmanes, estudiats immediatament o després d'un posterior període de recuperació de 10 setmanes. **A-B.** Crestes tractades 4 setmanes amb IDPN 10mM. **C-D.** Crestes tractades 10 setmanes amb IDPN 10mM. **E-F.** Crestes obtingudes després del període de recuperació de 10 setmanes.

Es va observar en els utricles que a les 4 setmanes de tractament amb IDPN 10mM (Fig. R13.A-B) els feixos ciliars de les cèl·lules ciliades i les microvellositats de les cèl·lules de suport tenien un aspecte idèntic als control (Fig. R5.C-D). A les 10 setmanes de tractament amb IDPN 10mM (Fig. R13.C) i a les 10 setmanes de recuperació (Fig. R13.D-F) es podia apreciar algun cili en coalescència, però en una proporció petita de feixos.



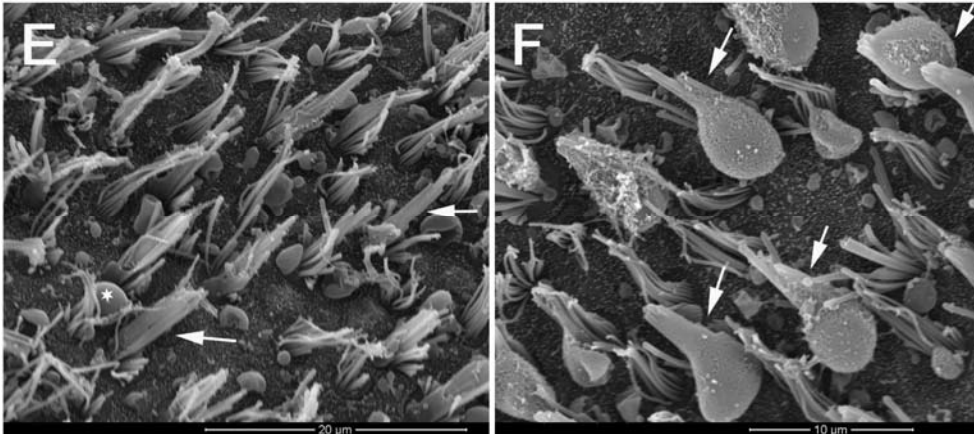


Figura R13. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM) d'utricles d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 10mM durant 4 i 10 setmanes, estudiats immediatament o després d'un posterior període de recuperació de 10 setmanes. Les fletxes blanques indiquen cèl·lules ciliades en extrusió. Els asteriscs blancs indiquen butllofes. **A-B.** Utricles tractats 4 setmanes amb IDPN 10mM. **C.** Utricles tractats 10 setmanes amb IDPN 10mM. **D-F.** Utricles obtinguts després del període de recuperació de 10 setmanes.

5.5. Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM)

Per tal de revelar més característiques ultraestructurals del dany ototòxic i la seva posterior recuperació, així com dels efectes ciliars, es van examinar les crestes per microscòpia electrònica de transmissió (TEM).

Les observacions ultraestructurals dels epitelis sensorials vestibulars dels individus control (n=3) s'ajustaven a les descrites a la literatura per crestes normals (Fig. R14). En particular, els calzes no estaven inflats (Fig. R14.A) i les unions septades (estructura especialitzada de contacte entre les cèl·lules ciliades de tipus I i el calze) es podien apreciar en tots els contactes basolaterals entre el calze i les cèl·lules ciliades de tipus I (Fig. R14.B-C).

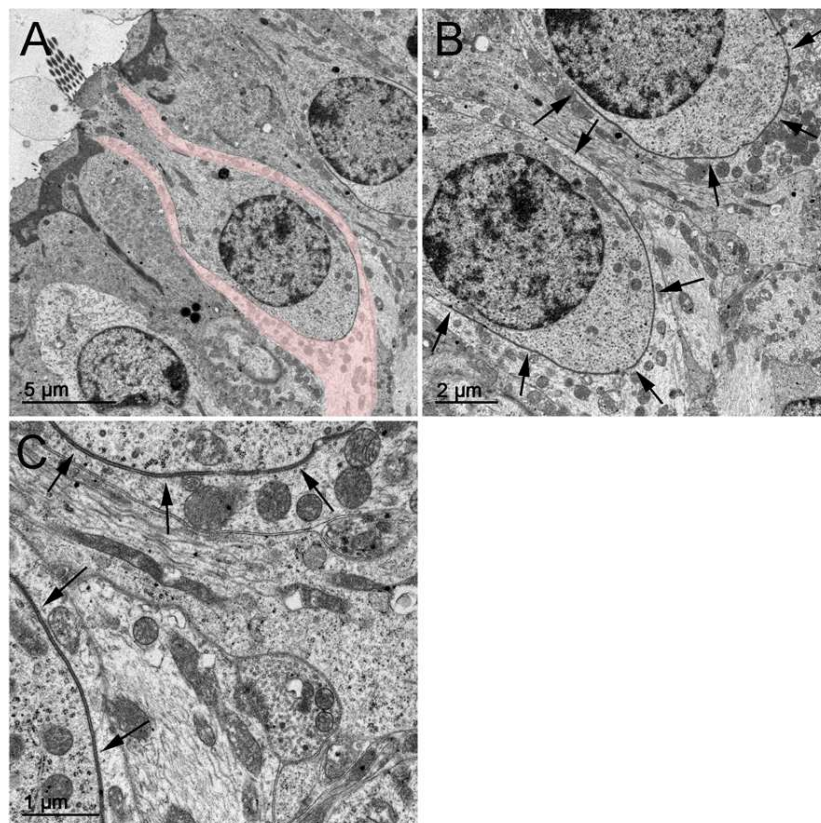


Figura R14. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de crestes d'animals control equivalents a temps d'exposició a la intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 4 setmanes i posterior període de recuperació de 4 setmanes. Les fletxes negres indiquen unions septades en bon estat. L'ombregjat rosa remarca la localització d'alguns dels calzes. **A.** Cresta control obtinguda a les 4 setmanes d'experiment. **B-C.** Ampliacions de la mateixa cresta mostrada a A.

Dels 5 animals examinats per TEM amb 4 setmanes de tractament IDPN 20mM (VDR=11, 14, 15, 18 i 23) només un d'ells (Fig. R15.A), amb disfunció vestibular igual a 11 a les 4 setmanes de tractament, presentava unions septades fragmentades, mentre que els altres 4 animals més afectats a nivell comportamental (Fig. R15.B-E) presentaven una completa absència d'unions septades. En els dos animals que presentaven una major disfunció vestibular es va observar que els calzes estaven fragmentats (Fig. R15.E), i regions de la membrana basolateral de les cèl·lules ciliades de tipus I que normalment estan cobertes per calzes aferents no ho estaven. Es va poder

observar com la pèrdua de les unions septades precedia a la fragmentació i retracció del calze, així com a l'extrusió de les cèl·lules ciliades, la qual no tenia lloc a les 4 setmanes, com es va veure gràcies a la microscòpia electrònica de rastreig, i que els feixos ciliars es preservaven al llarg del tractament. Una observació remarcable va ser l'absència dels calzes inflats, incloent tant aquells amb una morfologia general intacta però sense unions septades com aquells que mostraven fragmentació evident.

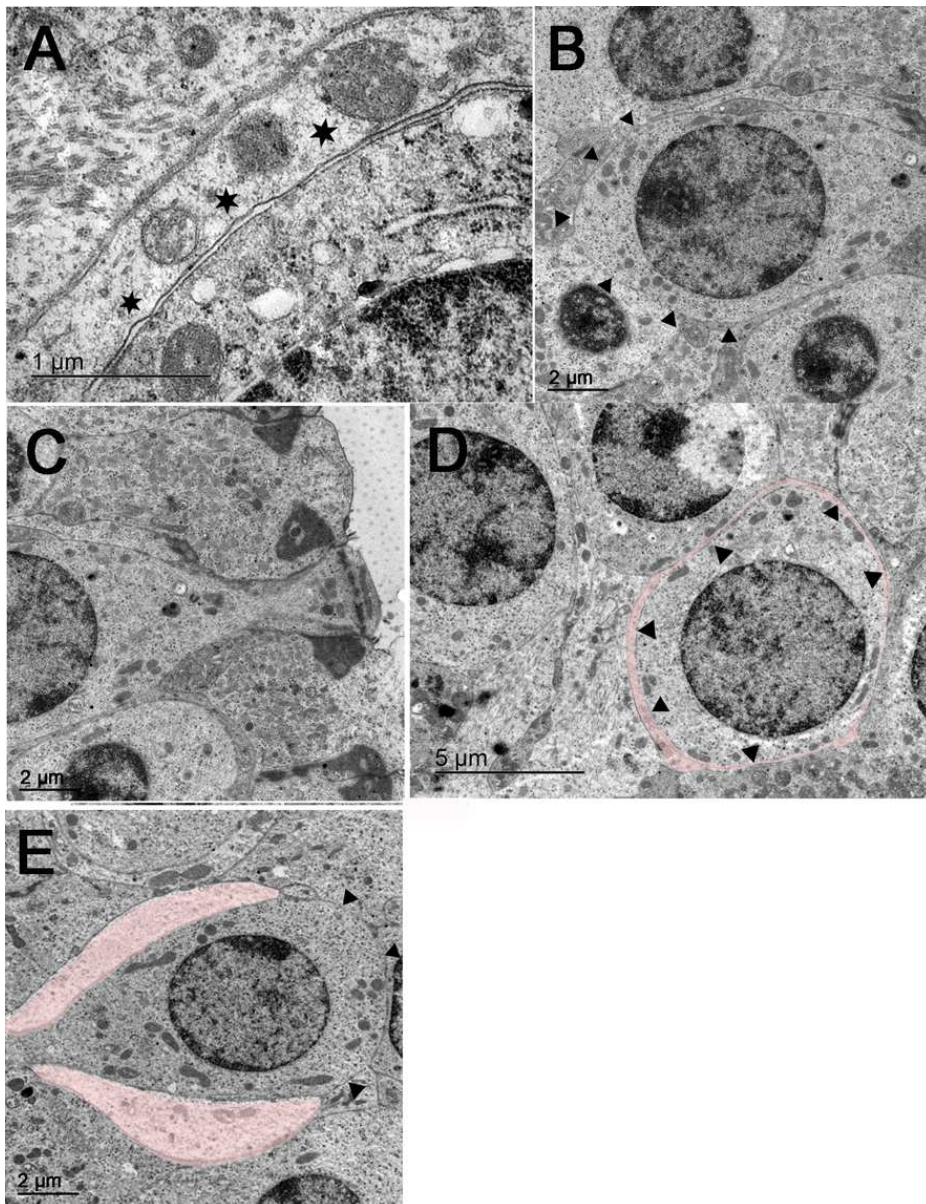
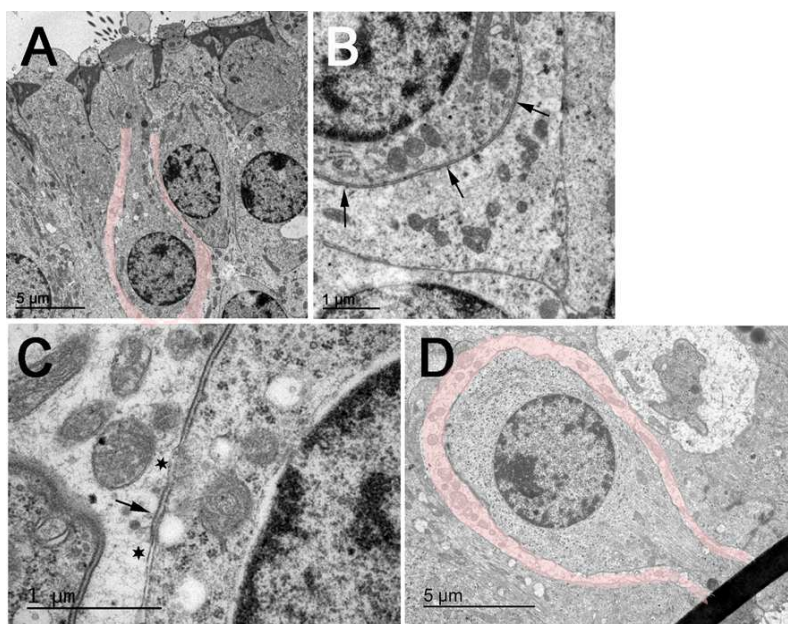


Figura R15. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de crestes d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 4 setmanes. Els caps de fletxa negres marquen la pèrdua de les unions septades. Els asteriscs negres mostren la fragmentació de les unions septades. L'ombrejat rosa remarca la localització d'alguns dels calzes. Quan hi ha diversos fragments d'unió septada sencers i trencats només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. **A.** VDR= 11, **B-D.** VDR=18 i **E.** VDR=23.

Al final del període de recuperació, en els individus que presentaven recuperació vestibular completa (valors de disfunció vestibular entre 0 i 2) (Fig. R16) s'observava que tenia lloc una completa recuperació de la posició del calze (Fig. R16.A, D i G) així com una recuperació pràcticament completa de les unions septades a totes les cèl·lules de tots els animals examinats (Fig. R16.B i E), encara que hi havia alguna evidència de que encara s'estaven formant (Fig. R16.C, F i H). Després del període de recuperació hi havia un individu que no presentava una completa recuperació de la funció vestibular (VDR=10), es va poder observar que el calze es trobava en perfecte estat (Fig. R17.A), tot i que encara s'apreciava alguna fragmentació de les unions septades (Fig. R17.D). No obstant, en aquest individu, es va poder observar la presència d'unions septades ben formades (Fig. R17.C) en cèl·lules amb els cilis en coalescència (Fig. R17.B).



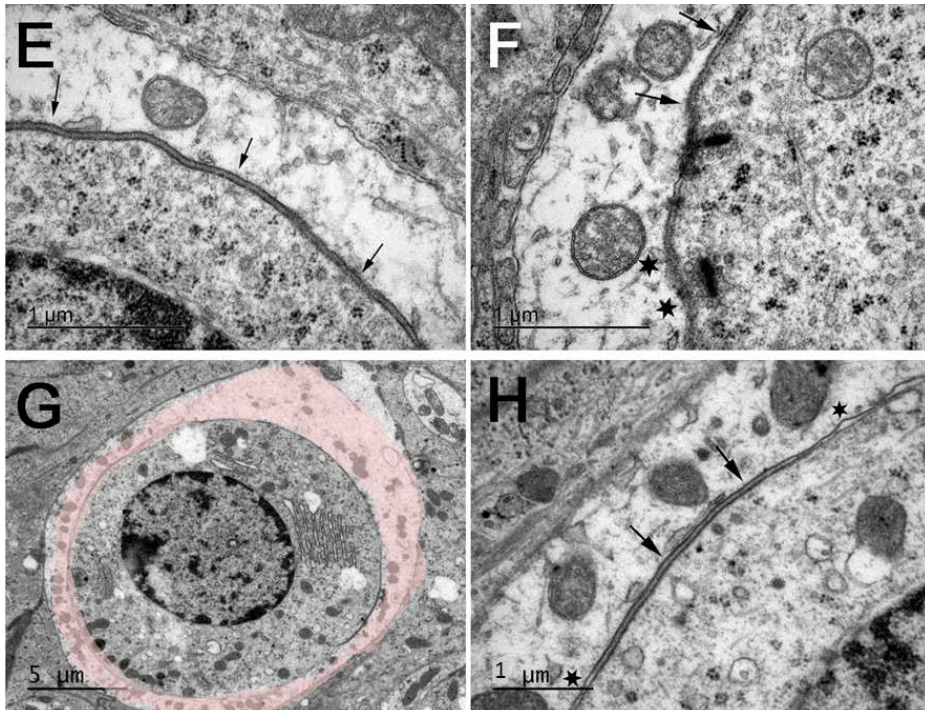


Figura R16. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de crestes d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 4 setmanes amb recuperació completa de la disfunció vestibular a les 4 setmanes post-tractament. Les fletxes negres indiquen unions septades en bon estat. Els asteriscs negres mostren la fragmentació de les unions septades. L'ombrejat rosa remarca la localització d'alguns dels calzes. Quan hi ha diversos fragments d'unió septada sencers i trencats només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. **A.** VDR=0, amb disfunció vestibular de 14 al final del període de tractament. **B-C.** Ampliació de la mateixa cresta mostrada a A. **D.** VDR=2, amb disfunció vestibular de 15 a les 4 setmanes d'administració. **E-F.** Ampliació de la cresta mostrada a D. **G.** VDR=1, amb disfunció vestibular de 17 a les 4 setmanes. **H.** Ampliació de la cresta mostrada a G.

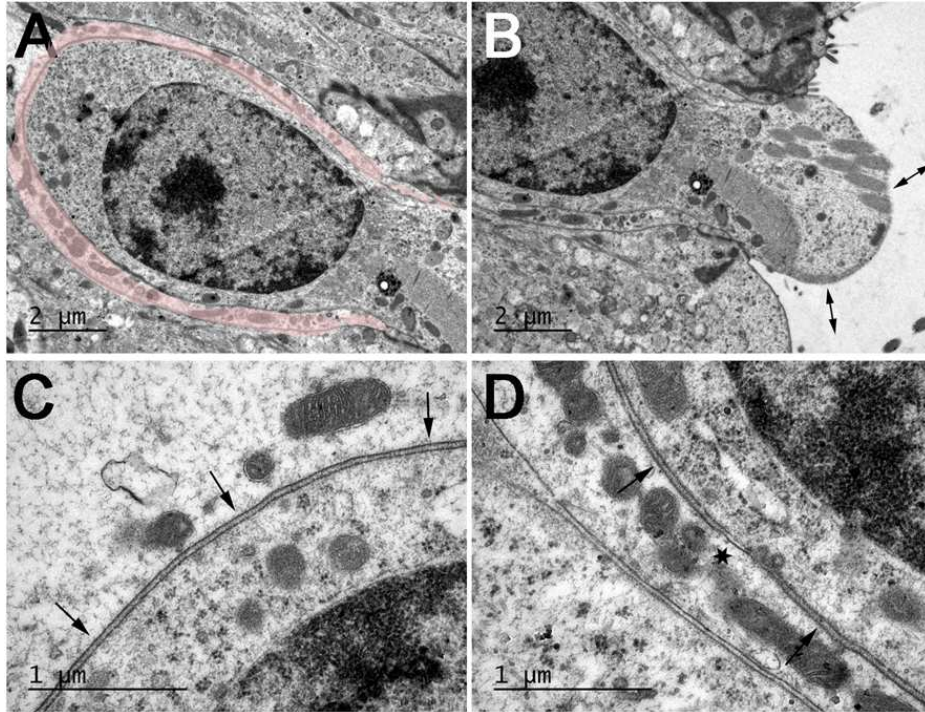


Figura R17. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de crestes d'animals exposats a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 4 setmanes sense recuperació completa de la disfunció vestibular a les 4 setmanes post-tractament. Les fletxes negres indiquen unions septades en bon estat. Els asteriscs negres mostren la fragmentació de les unions septades. L'ombregjat rosa remarca la localització d'alguns dels calzes. Quan hi ha diversos fragments d'unió septada sencers i trencats només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. Les dobles fletxes negres indiquen cilis en coalescència. **A-D.** Diversos fragments d'una mateixa cèl·lula ciliada de tipus I en la cresta d'un animal sense recuperació completa de la disfunció vestibular després de les 4 setmanes de descans, VDR=10, a les 4 setmanes de tractament mostrava una disfunció vestibular de 18.

Dels individus que van ser administrats amb IDPN 20mM durant 6 setmanes, passades les 6 setmanes de recuperació dos d'ells no presentaven recuperació completa de la disfunció vestibular, mostrant uns valors de 14 i 9. Com ja es va observar per mitjà de la microscòpia electrònica de rastreig, quan la recuperació no era completa les rates presentaven coalescència dels cilis (Fig. R18.A-B). Es va poder observar com en un mateix individu hi havia presència de cèl·lules ciliades en bon estat (presència d'unions

septades i calze) i cèl·lules ciliades en degeneració a les quals no s'observava calze ni unions septades i es podien apreciar vacuoles a l'interior del citosol (Fig. R18.C). Quan es van ampliar les cèl·lules ciliades en bon estat (Fig. R18.D) es va poder apreciar com els calzes es mantien però en canvi les unions septades estaven fragmentades (Fig. R18.E).

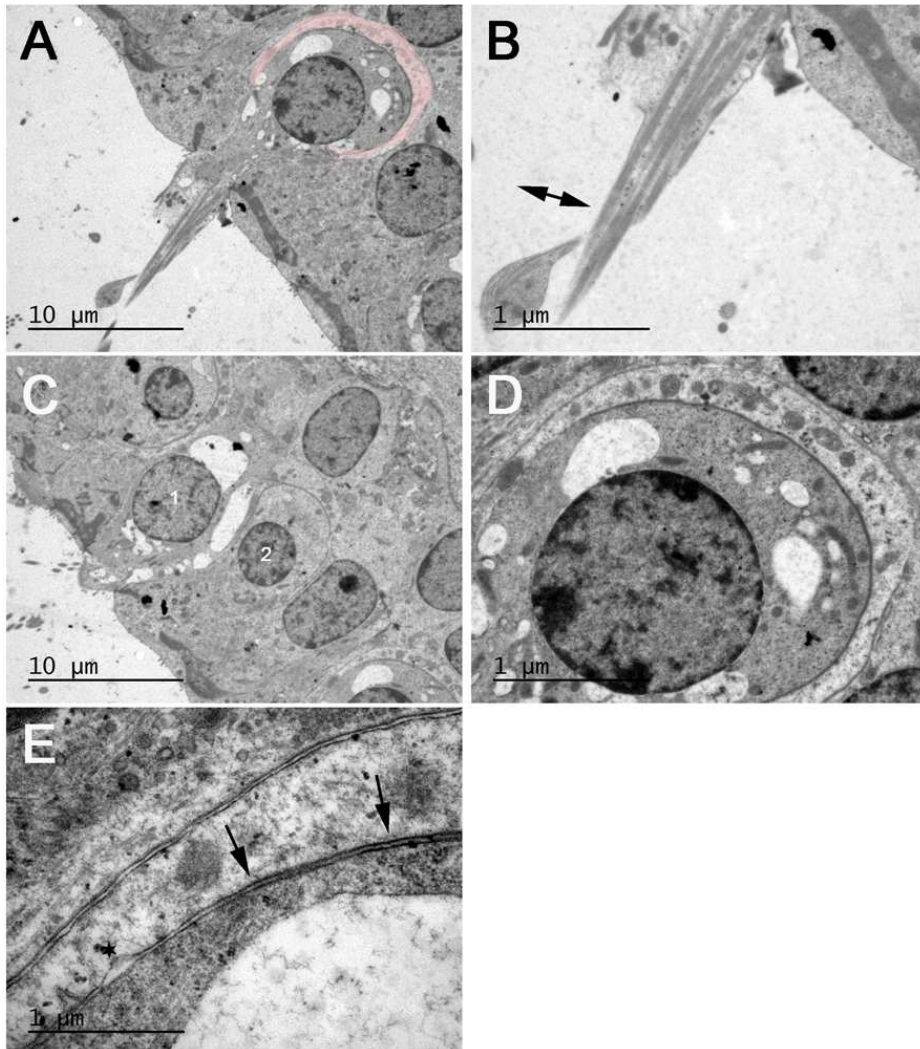


Figura R18. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de cresta d'animal exposat a intoxicació crònica d'IDPN 20mM durant 6 setmanes i posterior període de recuperació de 6 setmanes sense recuperació completa de la funció vestibular, a les 6 setmanes de recuperació presentava VDR=14. Les fletxes negres indiquen unions septades en bon estat. Els asteriscs

negres mostren la fragmentació de les unions septades. La doble fletxa negra indica cilis en coalescència. L'ombregjat rosa remarca la localització d'alguns dels calzes. Quan hi ha diversos fragments d'unió septada sencers i trencats només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge. **A.** Cèl·lula ciliada amb els cilis en coalescència. **B.** Ampliació dels cilis en coalescència mostrats a **A.** **C.** En el mateix individu s'observen cèl·lules en bon estat (2) i cèl·lules amb degeneracions patològiques (1). **D.** Ampliació cèl·lula ciliada en bon estat amb presència d'unions septades i calze. **E.** Ampliació del calze mostrat a **D** on s'aprecia que les unions septades estan fragmentades.

Per mitjà de la microscòpia electrònica de transmissió es va poder observar com individus administrats amb IDPN 10mM durant 10 setmanes, que no presentaven disfunció vestibular al llarg del tractament i que per mitjà de SEM presentaven una morfologia ciliar de les cèl·lules ciliades correcta, mostraven fragmentació de les unions septades previ a la deslocalització del calze (Fig. R19.A-D).

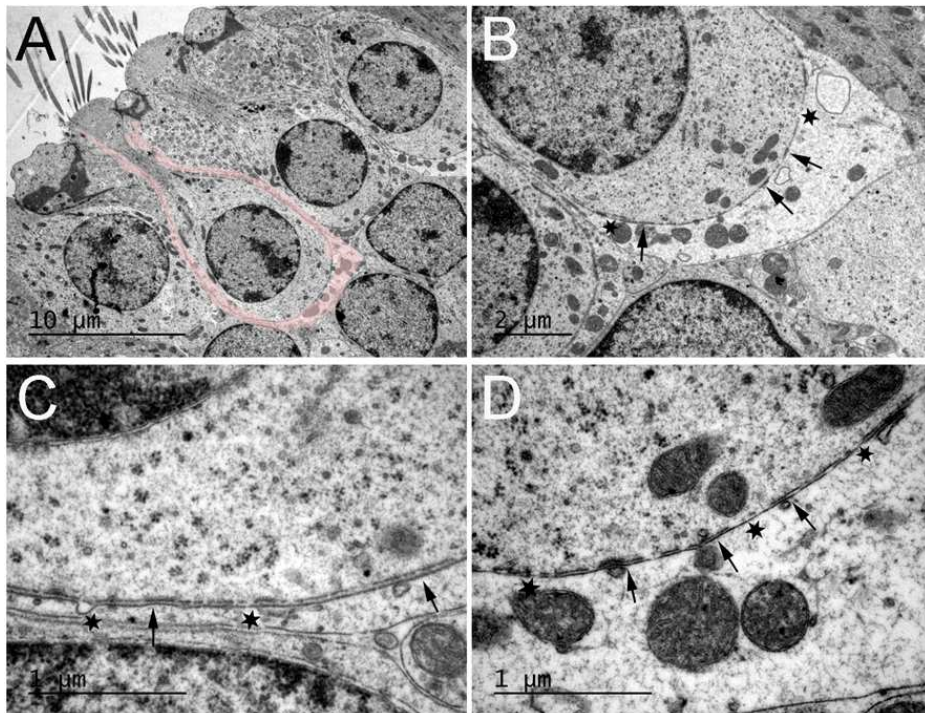


Figura R19. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de cresta d'animal exposat a intoxicació crònica d'IDPN 10mM durant 10 setmanes. Les fletxes negres indiquen unions

septades en bon estat. Els asteriscs negres mostren la fragmentació de les unions septades. L'ombregat rosa remarca la localització d'alguns dels calzes. Quan hi ha diversos fragments d'unió septada sencers i trencats només se'n remarquen alguns per no sobrecarregar la imatge.

A. *Cèl·lula ciliades amb el calze en bon estat. B-D.* *Ampliacions del calze mostrat a A.*

CAPÍTOL III
CARACTERITZACIÓ
MOLECULAR

5.6. Immunohistoquímica i Microscòpia de Fluorescència Confocal

5.6.1. Efecte de l'IDPN 20mM sobre les Unions Septades

Per tal de caracteritzar la dinàmica del dany aferent i del procés de reparació, es va estudiar per immunohistoquímica i microscòpia de fluorescència confocal l'expressió de proteïnes prèviament identificades en el contacte entre el calze aferent i la cèl·lula ciliada de tipus I. Degut als resultats ultraestructurals, l'estudi es va centrar en l'estat de les unions septades al final del període d'administració d'IDPN i al final del període de recuperació. Com s'ha mostrat en els capítols anteriors, els animals es van classificar segons el grau de disfunció vestibular $VDR \leq 17$ i $VDR \geq 18$, però els estudis quantitativs es van portar a terme amb animals que mostraven una disfunció vestibular intermèdia (VDR entre 12 i 17). Així, els animals control es van comparar amb animals que mostraven una disfunció vestibular intermèdia després de les 4 setmanes d'administració amb IDPN 20mM, i amb animals que a les 4 setmanes mostraven uns nivells de disfunció equivalents i que després del període de recuperació havien assolit una recuperació completa.

Les proteïnes estudiades es localitzen a la membrana neuronal postsinàptica —Caspr1 i KCNQ4— o a la matriu extracel·lular —Tenascina-C. Caspr1 (contactin-associated protein) es va identificar com un component clau de les unions septades dels mamífers, incloent aquelles que estan situades a les regions paranodals dels axons mielinitzats i aquelles situades entre les cèl·lules ciliades de tipus I i les aferències (Sousa *et al.*, 2009; Lysakowski *et al.*, 2011). KCNQ4 és un canal de potassi depenent de voltatge, que col·localitza amb Caspr1 a la membrana postsinàptica de les sinapsis en calze (Sousa *et al.*, 2009; Lysakowski *et al.*, 2011) i es redistribueix i apareix dispers al llarg de tota la membrana aferent en els ratolins nuls per Caspr1 (Sousa *et al.*, 2009). Tenascina-C és una proteïna de matriu extracel·lular que es troba adjacent a la membrana homohexamèrica que conté Caspr1 (Swartz & Santi, 1999; Lysakowski *et al.*, 2011), que es sap que interactua amb la Contactina (Falk *et al.*, 2002).

Per tal de poder comparar els diferents grups experimentals es van observar les mostres per microscòpia de fluorescència confocal utilitzant idèntiques condicions d'observació per a totes les mostres processades en paral·lel. Es van establir els ajustos (*settings*) de fluorescència amb les mostres control i es van mantenir els mateixos ajustos d'imatge en l'adquisició de les mostres dels animals tractats i les dels animals tractats i deixats recuperar. Per tal d'analitzar quantitativament els resultats es va mesurar la fluorescència de les diferents proteïnes de 10 cèl·lules/animal x 3 animals de cada un dels grups experimentals.

Per una banda, es va realitzar el triple marcatge de Caspr1 (anticòs policlonal de conill d'índies), KCNQ4 (anticòs policlonal de conill) i neurofilament (anticòs monoclonal clon N52 de ratolí). Estudis anteriors (Seoane *et al.*, 2003) havien demostrat la pèrdua de neurofilaments en les aferències vestibulars d'animals tractats amb IDPN subcrònic. Es va advertir que els individus control (Fig. R20.A-D) presentaven marcatge de Caspr1 a la zona basolateral del calze coincidint amb la zona de localització de les unions septades per microscòpia electrònica de transmissió, ja que Caspr1 és el nucli de la unió septada; KCNQ4, que és un canal de potassi situat a la cara interna del calze i que requereix Caspr1 per aquesta localització, també es va observar a la zona basolateral del calze col·localitzant amb Caspr1 en els individus control; pel que fa als neurofilaments es va observar marcatge de les fibres nervioses cap a l'interior de l'epiteli sensorial on s'observa una estructura filamentosa fina a les terminals aferents del calze (Seoane *et al.*, 2003). Els individus tractats amb IDPN 20mM durant 4 setmanes, amb disfunció vestibular inferior o igual a 17 (Fig. R20.E-H) i amb disfunció vestibular igual o superior a 18 (Fig. R20.I-L), mostraven desaparició de Caspr1, sent aquesta desaparició completa en els individus amb $VDR \geq 18$; el que comportava la reorganització de KCNQ4 de la cara interna (i, i') a la cara externa (o, o') del calze (Fig. R21) —tal com tenia lloc en els ratolins nuls per Caspr1—; així com pèrdua de la immunoreactivitat del neurofilament, més notablement a la part apical (Seoane *et al.*, 2003) amb desaparició i reorganització dels neurofilaments en manyocs al voltant del calze. Després del període de recuperació de 4 setmanes posterior a les 4 setmanes d'administració amb IDPN 20mM (Fig. R20.M-P) es va observar reaparició de Caspr1 a la cara interna del calze, reorganització de KCNQ4 a la cara interna associada amb la

recuperació de Caspr1 i reorganització dels neurofilaments cap a la part apical de la terminal.

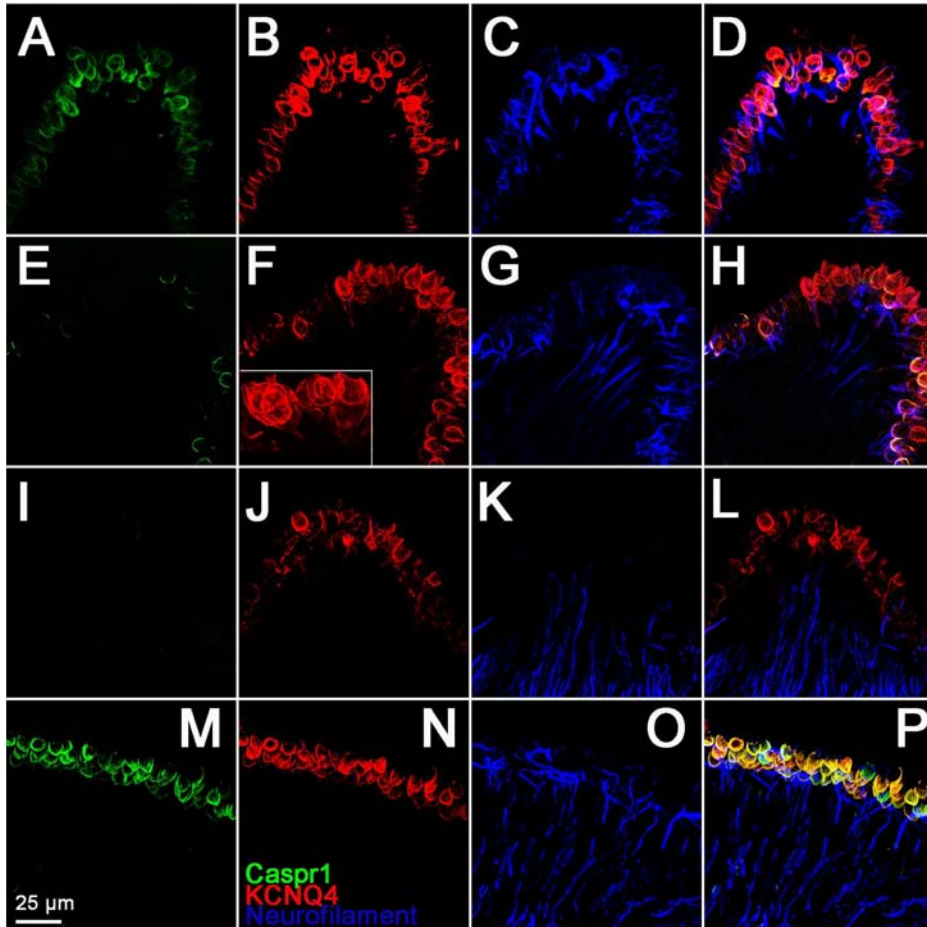


Figura R20. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM sobre l'expressió a les crestes vestibulars de les proteïnes Caspr1 (verd – A, E, I i M), KCNQ4 (vermell – B, F, J i N) i neurofilament (blau – C, G, K i O). A la columna de la dreta (D, H, L i P) es mostren conjuntament els tres marcatges. En groc col·localització entre Caspr1 i KCNQ4. **A-D.** Cresta individu control. **E-H.** Cresta individu tractat 4 setmanes amb IDPN 20mM amb disfunció vestibular ≤ 17 , VDR=12. **I-L.** Cresta individu tractat 4 setmanes amb IDPN 20mM amb disfunció vestibular ≥ 18 , VDR=23. **M-P.** Cresta individu administrat amb IDPN 20mM 4 setmanes i 4 setmanes de recuperació.

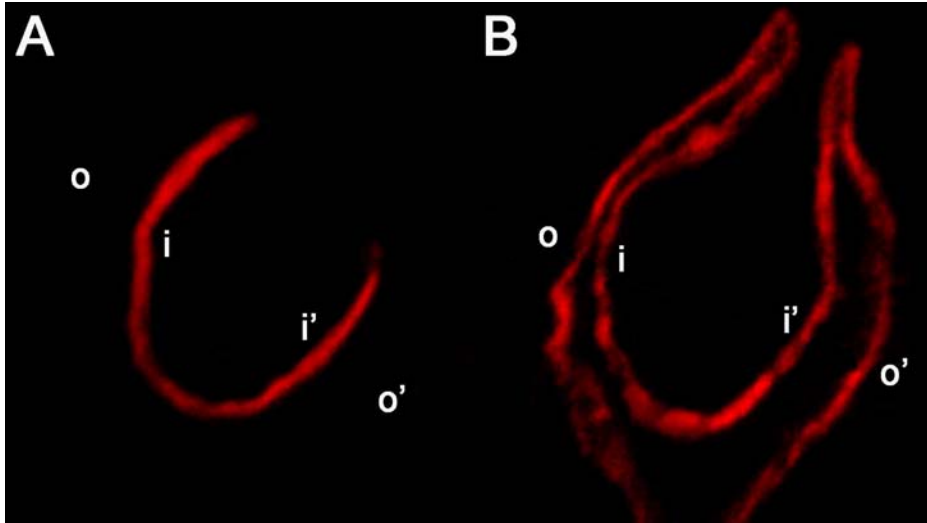


Figura R21. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM en la localització del canal de potassi, KCNQ4. Immunohistoquímica i microscòpia òptica de fluorescència confocal. **A.** Cèl·lula ciliada de tipus I individu control. **B.** Cèl·lula ciliada de tipus I individu tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes amb reorganització de KCNQ4 de les cares internes i, i' (inner faces) a les cares externes o, o' (outer faces) del calze.

Per tal d'analitzar quantitativament aquests resultats es va determinar la fluorescència de les cares internes i externes del calze de Caspr1 i KCNQ4 (Fig. R22), tal com s'ha descrit a l'apartat de Materials i Mètodes. Les dades obtingudes indicaven que desapareixien gairebé per complet els pics de fluorescència corresponents a Caspr1 de les cares internes (i, i') (Fig. R23.A). A diferència de Caspr1, el KCNQ4 no desapareixia sinó que es deslocalitzava, alterant la seva distribució (Fig. R23.B) de la cara interna a la cara externa del calze donant lloc a la formació de dos pics per banda corresponents a les cares externes i internes de cada costat del calze. En els animals tractats als que es va permetre un període de recuperació es va observar reaparició de Caspr1 al final d'aquest període i la consegüent reorganització del canal de potassi cap a la cara interna del calze.

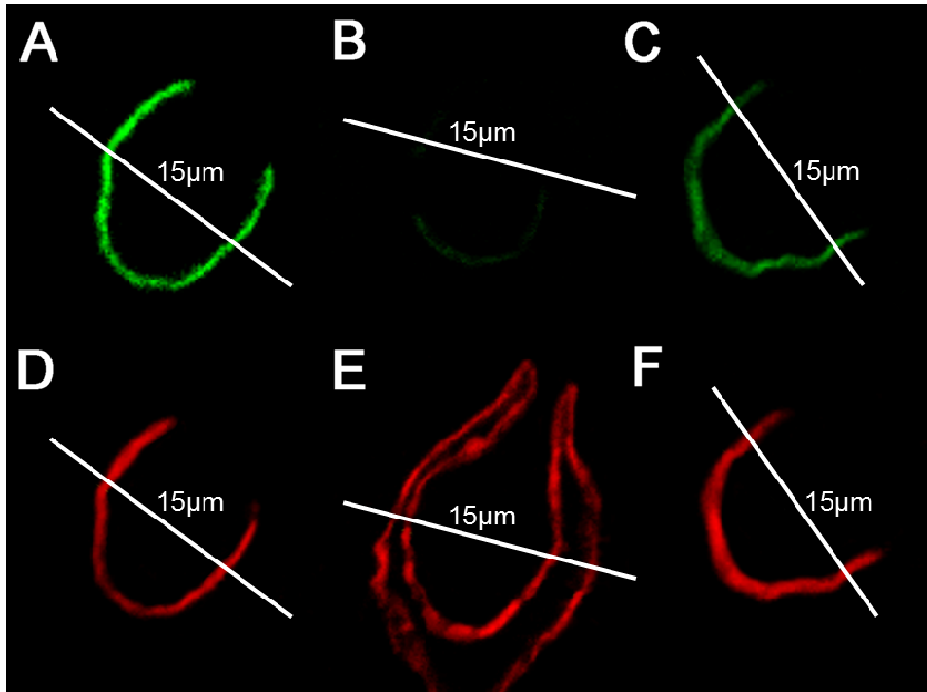
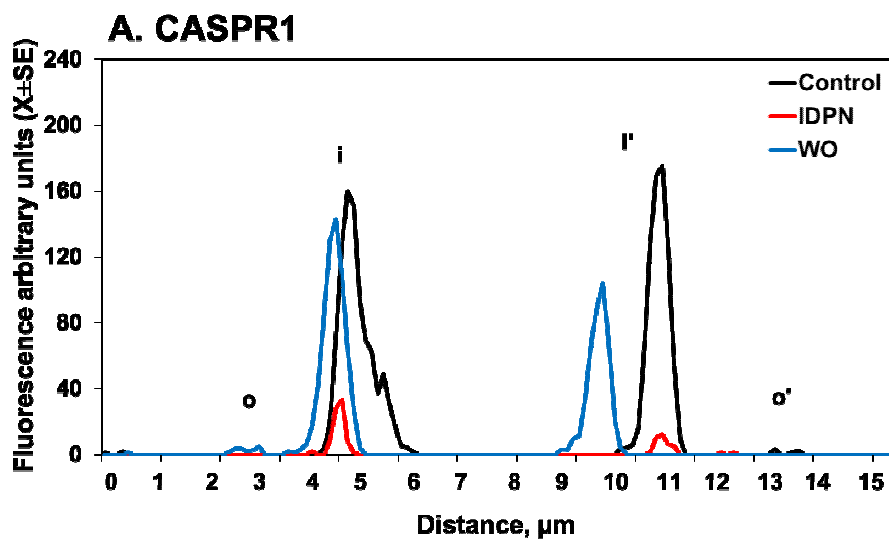


Figura R22. Quantificació de la fluorescència de Caspr1 i KCNQ4 de la cara interna i externa del calze. En verd (A-C) Caspr1 i en vermell (D-F) KCNQ4. **A i D.** Cèl·lula ciliada individu control, **B i E.** Cèl·lula ciliada individu administrat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes i **C i F.** Cèl·lula ciliada individu tractat amb IDPN 20mM 4 setmanes i 4 setmanes de recuperació.



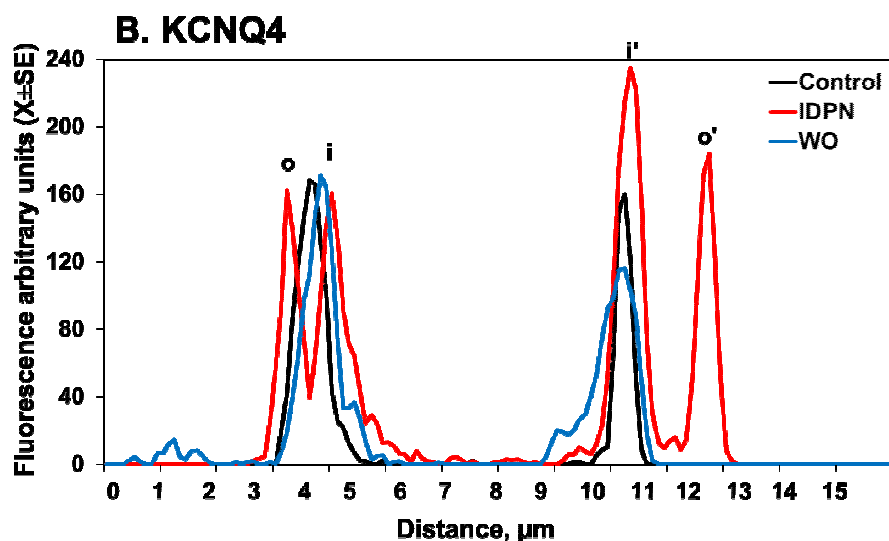


Figura R23. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM en la distribució de les proteïnes implicades en les unions septades. Anàlisi de la fluorescència al llarg d'una línia de 15μm que creua la cèl·lula i el calze, mostrant pics corresponents a les cares internes (i, i') i externes (o, o') del calze. Els gràfics mostren els resultats de distribució de fluorescència de 3 cèl·lules representatives, una per cada condició experimental. WO (Wash-Out, període de recuperació). A. Distribució de Caspr1. B. Distribució de KCNQ4.

Els resultats obtinguts es mostren a la Figura R24, en unitats de fluorescència arbitrària. L'anàlisi d'aquests resultats va permetre constatar que havia diferències estadísticament significatives tant per Caspr1 (Fig. R24.A) a les cares internes — $F(2,87)=93.8$ i $p=0.000$ — com per KCNQ4 (Fig. R24.B) tant a les cares internes com a les cares externes — $F(2,87)=11.0$ i $p=0.000$; $F(2,87)=76.1$ i $p=0.000$ — respectivament. Les comparacions múltiples (post-hoc, test de Duncan) van demostrar diferències significatives ($p<0.05$) per Caspr1 entre el grup control (a) i el grup tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (b), així com amb el grup amb 4 setmanes de recuperació (c); la qual cosa confirmava que a les 4 setmanes de tractament amb IDPN 20mM tenia lloc la desaparició de Caspr1 de les cares internes i que aquesta recuperava la seva posició després del període de recuperació de 4 setmanes, tot i que els valors de fluorescència eren estadísticament diferents als controls, el que indicava que la recuperació no era completa després de les 4 setmanes de descans. Pel que fa al canal de potassi, es van

observar diferències significatives entre el grup control i el grup amb 4 setmanes de recuperació (a) amb el grup tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (b), la qual cosa confirmava la reorganització de KCNQ4 de les cares internes a les cares externes del calze després de les 4 setmanes d'administració amb IDPN 20mM, així com la reorganització d'aquest a les cares internes del calze després de les 4 setmanes de recuperació, el que confirmava que la reorganització de KCNQ4 anava lligada amb la reparació de Caspr1 després del període de descans.

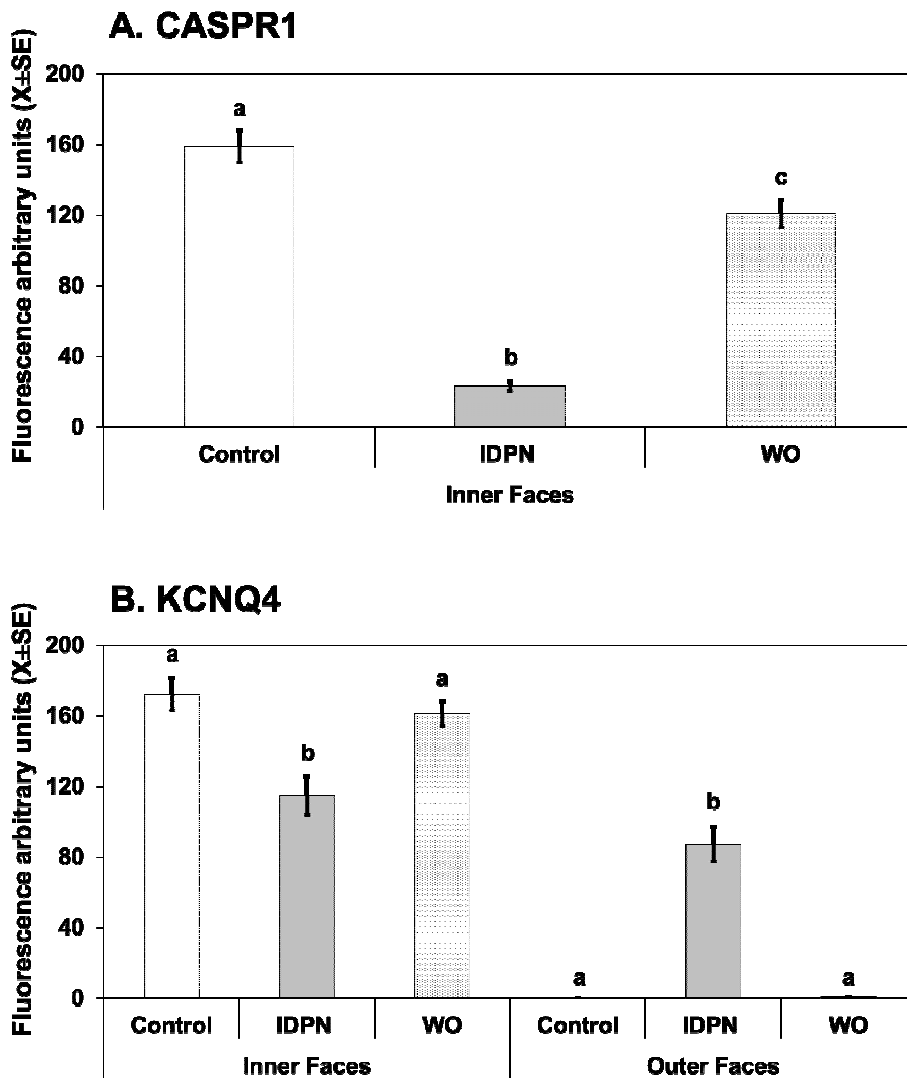


Figura R24. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM durant 4 setmanes en les proteïnes implicades en les unions septades. Representat com l'anàlisi quantitatiu de la fluorescència dels pics de les cares internes (inner faces) i de les cares externes del calze (outer faces). (a), (b) i (c) mostren diferències significatives entre grups ($p < 0.05$). WO (Wash-Out, període de recuperació). **A.** Caspr1. **B.** KCNQ4.

Per altra banda, es va realitzar la doble immunohistoquímica de Caspr1 (anticòs monoclonal clon K65/35 de ratolí) i Tenascina-C (anticòs policlonal de conill) en cresta per tal d'estudiar la possible afectació de l'administració d'IDPN a la matriu extracel·lular i poder relacionar els seus efectes amb les proteïnes implicades en les unions septades. Es va observar que Tenascina-C tenia un comportament similar a Caspr1 (nucli de les unions septades); es perdia durant l'ototoxicitat crònica (Fig. R25.D-F) en comparació amb els control (Fig. R25.A-C) i es recuperava durant el període de recuperació posterior a l'administració (Fig. R25.G-I).

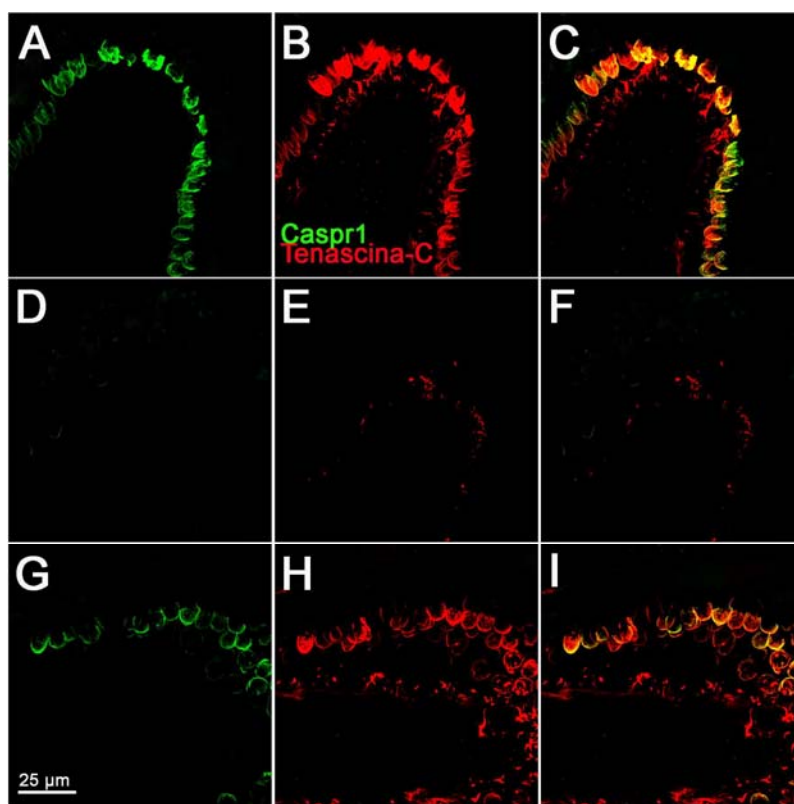
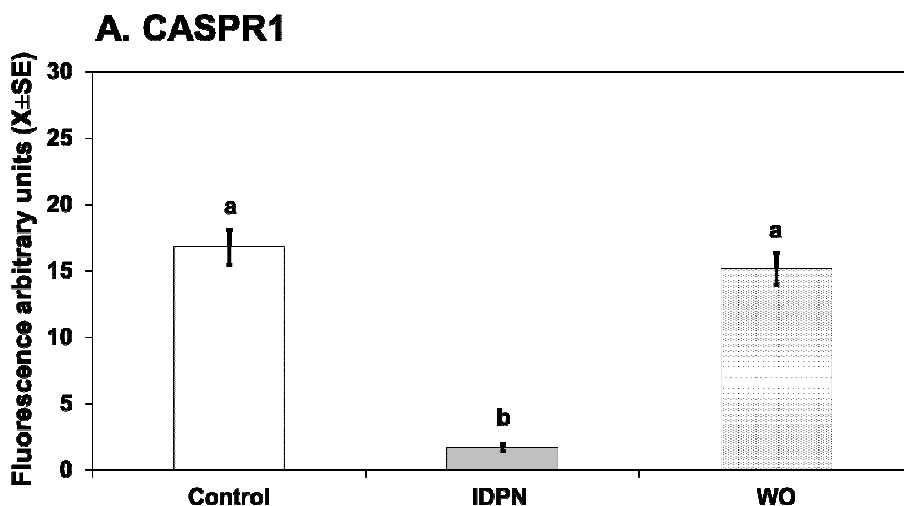


Figura R25. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM sobre l'expressió a les crestes vestibulars de la proteïna Caspr1 (verd – A, D i G) i Tenascina-C (vermell – B, E i H). A la columna de la dreta (C, F i I) es mostren conjuntament els dos marcatges. En groc col·localització entre Caspr1 i Tenascina-C. **A-C.** Cresta individu control. **D-F.** Cresta individu tractat 4 setmanes amb IDPN 20mM. **G-I.** Cresta individu administrat amb IDPN 20mM 4 setmanes i 4 setmanes de recuperació.

Es va portar a terme una anàlisi de la fluorescència total de Tenascina-C (Fig. R26.B) i Caspr1 (Fig. R26.A). Es va comparar la fluorescència en les diferents condicions experimentals, el que va permetre constatar que aquestes diferències observades eren estadísticament significatives tant per Caspr1 $-F(2,87)=59.5$ i $p=0.000$ — com per Tenascina-C $-F(2,87)=102.9$ i $p=0.000$ —. Les comparacions múltiples (post-hoc, test de Duncan) van demostrar diferències significatives ($p<0.05$) entre els grups control i recuperació (a) i el grup tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (b), la qual cosa indicava que hi havia una pèrdua i posterior recuperació de la fluorescència total de Caspr1. Pel que fa a la Tenascina-C, les diferències significatives ($p<0.05$) entre els grups control (a), el grup tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (b) i el grup amb recuperació (c) mostraven una pèrdua i posterior recuperació incompleta de Tenascina-C.



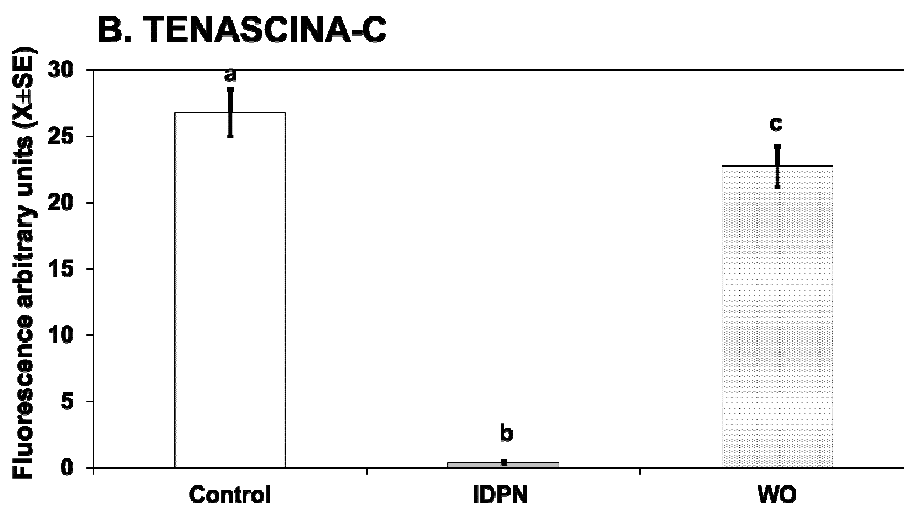


Figura R26. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM sobre *Caspr1* i *Tenascina-C*, mesurada com a fluorescència total mitjana de 30 cèl·lules en immunofluorescència. (a), (b) i (c) mostren diferències significatives entre grups ($p < 0.05$). **A.** *Caspr1*. **B.** *Tenascina-C*.

5.6.2. Efecte de l'IDPN 10mM sobre les Unions Septades

Les observacions prèvies revelaven una pèrdua pràcticament completa de les unions septades en associació amb una toxicitat vestibular crònica i la seva reconstrucció després del període de recuperació. No obstant, no es revelava com tenia lloc el desmantellament. Per tal de fer front a aquest tema, es va estudiar l'efecte d'una exposició a IDPN 10mM durant 10 setmanes, ja que les dades prèvies (Seoane *et al.*, 2001b) suggerien que el desmantellament de les unions septades estava en curs en aquests animals. Per tal d'acabar d'establir la relació amb el dany aferent observat per microscòpia confocal es va realitzar un doble marcatge de cresta —*Caspr1* (anticòs monoclonal clon K65/35 de ratolí) i *KCNQ4* (anticòs policlonal de conill)— de tres individus tractats amb IDPN 10mM durant 10 setmanes. En aquests individus es va determinar el percentatge de cèl·lules amb deslocalització de *KCNQ4* respecte al total de cèl·lules observades. Cap d'aquests individus presentava disfunció vestibular òbvia al llarg de les 10 setmanes de tractament amb IDPN 10mM. Es va observar que la desaparició de *Caspr1* amb la consegüent reorganització de *KCNQ4* de la cara interna a

la cara externa del calze (Fig. R27), es donava de manera discreta, cèl·lula a cèl·lula (Fig. R28) i no de manera uniforme i progressiva en totes les cèl·lules de l'individu, ja que en un mateix individu s'observaven cèl·lules ciliades amb una completa col·localització entre Caspr1 i KCNQ4 i cèl·lules ciliades amb una completa desaparició de Caspr1 i deslocalització del canal de potassi. El percentatge mig de cèl·lules amb desaparició de Caspr1 i la consegüent deslocalització de KCNQ4 era d'un 23%. Aquest dany aferent té lloc abans que s'observi la disfunció vestibular.

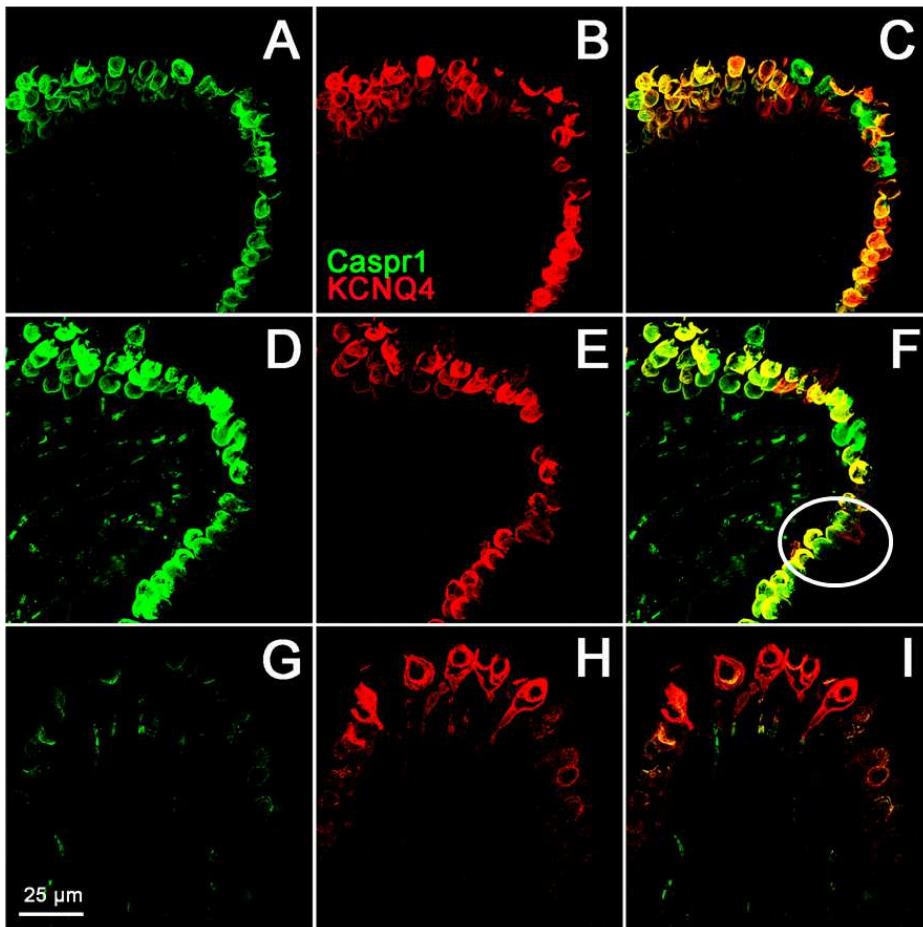


Figura R27. Efecte de l'administració d'IDPN 10mM durant 10 setmanes sobre les unions septades. Caspr1 (verd – A, D i G) i KCNQ4 (vermell – B, E i H). A la columna de la dreta (C, F i I) es mostren conjuntament els dos marcatges. En groc col·localització entre Caspr1 i KCNQ4. A-C. Cresta individu control. D-F. Cresta individu administrat amb IDPN 10mM durant 10 setmanes sense afectació vestibular però amb un 5% de les cèl·lules amb

deslocalització de KCNQ4. **G-I.** Cresta individu tractat amb IDPN 10mM 10 setmanes sense afectació vestibular però amb un 64% de les cèl·lules amb deslocalització de KCNQ4.

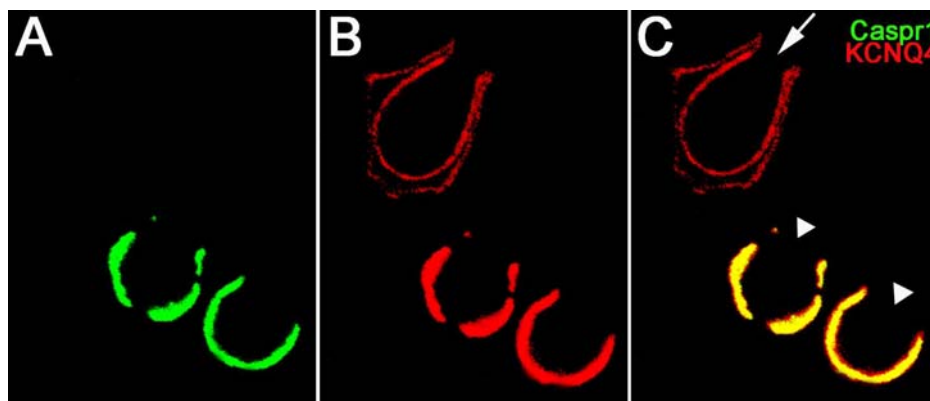


Figura R28. Ampliació de la zona marcada de la Figura R27.F. Efecte de l'administració d'IDPN 10mM durant 10 setmanes en les proteïnes de les unions septades. **A.** En verd Caspr1. **B.** En vermell KCNQ4. **C.** En groc col·localització entre Caspr1 i KCNQ4. Els caps de fletxa blancs indiquen la col·localització entre Caspr1 i KCNQ4. Les fletxes blanques mostren la desaparició de Caspr1 i deslocalització de KCNQ4 de la cara interna a la cara externa del calze.

Es va portar a terme una anàlisi de la fluorescència total de Caspr1 en les cèl·lules ciliades de tipus I amb deslocalització de KCNQ4 i en les cèl·lules ciliades de tipus I on no tenia lloc la deslocalització de KCNQ4, el que va permetre comprovar que la intensitat de fluorescència de Caspr1 de les cèl·lules sense deslocalització era idèntica a la intensitat de fluorescència de les cèl·lules ciliades de tipus I que s'observaven en els controls (Fig. R29), independentment que l'individu tingués altres cèl·lules ciliades afectades. Per altra banda, es va constatar com la intensitat total de fluorescència de les cèl·lules ciliades de tipus I amb deslocalització de KCNQ4 es veia molt disminuïda.

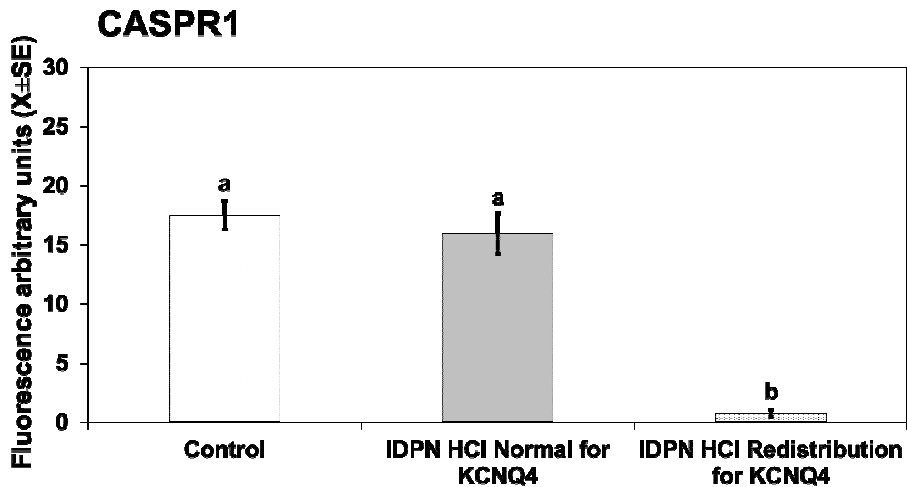


Figura R29. Efecte de l'administració d'IDPN 10mM en la redistribució de KCNQ4 en les cèl·lules ciliades de tipus I (HCl). Representat com l'anàlisi quantitatiu de la fluorescència total de Caspr1 en les cèl·lules ciliades de tipus I amb redistribució de KCNQ4 i en les cèl·lules ciliades de tipus I sense redistribució de KCNQ4. (b) Diferències significatives respecte a la mitjana control ($p < 0.05$).

Es van observar diferències estadísticament significatives per Caspr1 — $F(2,75)=32.8$ i $p=0.000$ —. Les comparacions múltiples (post-hoc, test de Duncan) van demostrar diferències significatives ($p < 0.05$) entre el grup control i el grup de cèl·lules ciliades de tipus I sense deslocalització de KCNQ4 (a) amb el grup de cèl·lules ciliades de tipus I amb deslocalització del canal de potassi (b). Això indicava que hi havia una desaparició de Caspr1 cèl·lula a cèl·lula i que les cèl·lules que encara no es veien afectades per la desaparició de Caspr1 i la consegüent deslocalització de KCNQ4 presentaven uns nivells de fluorescència de Caspr1 equivalents als control.

Per tal d'establir en quin moment tenia lloc l'afectació de la matriu extracel·lular, es va realitzar un doble marcatge de cresta —Caspr1 (anticòs monoclonal clon K65/35 de ratolí) i Tenascina-C (anticòs policlonal de conill) dels mateixos tres individus administrats amb IDPN 10mM durant 10 setmanes en els quals es va analitzar la intensitat de fluorescència total de Caspr1 en funció de la deslocalització de KCNQ4

en les cèl·lules ciliades de tipus I (Fig. R30). Es va portar a terme aquest doble marcatge ja que la combinació dels anticossos Tenascina-C i KCNQ4 no era viable ja que tots dos eren anticossos policlonals de conill. Amb això, es va constatar que l'afectació de Tenascina-C anava lligada amb la desaparició de Caspr1 ja que quan desapareixia Caspr1 també desapareixia Tenascina-C, que aquesta deslocalització tenia lloc cèl·lula a cèl·lula i que era anterior a la presència d'efectes vestibulars.

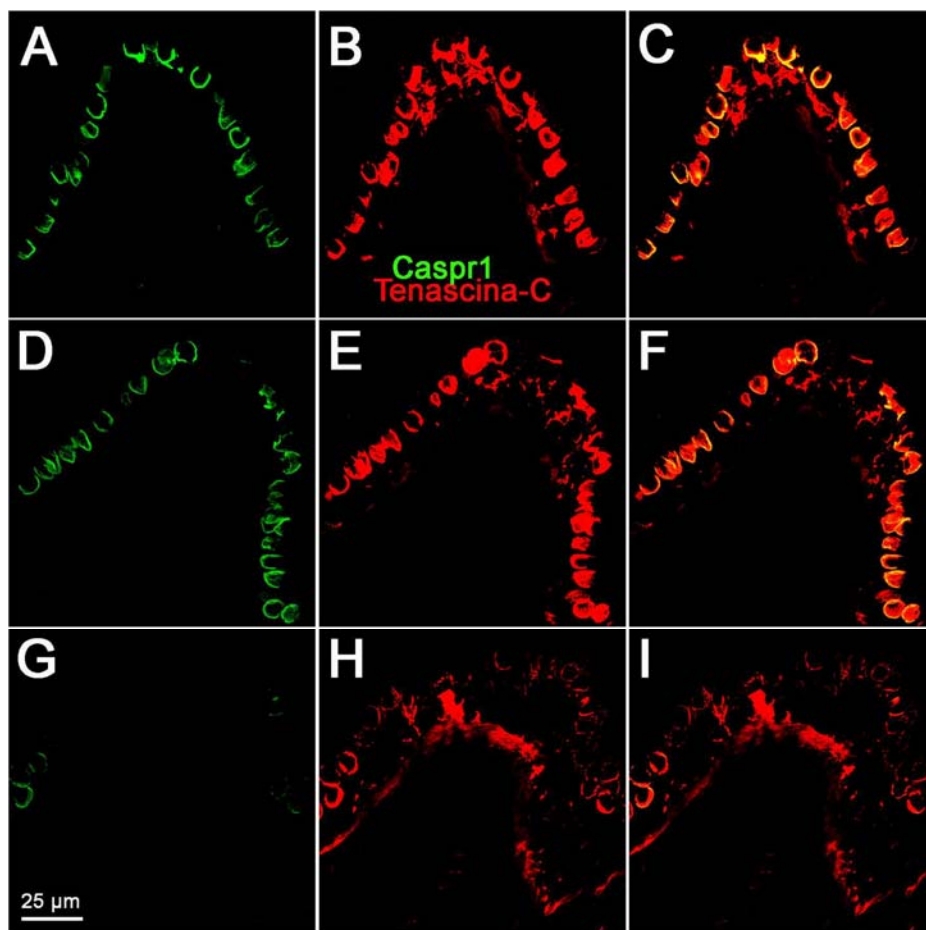


Figura R30. Efecte de l'administració d'IDPN 10mM durant 10 setmanes sobre la matriu extracel·lular. Caspr1 (verd – A, D i G) i Tenascina-C (vermell – B, E i H). A la columna de la dreta (C, F i I) es mostren conjuntament els dos marcatges. En groc col·localització entre Caspr1 i Tenascina-C. A-C. Cresta individu control. D-F. Cresta individu administrat amb IDPN 10mM durant 10 setmanes sense afectació vestibular però amb un 5% de les cèl·lules

amb deslocalització de KCNQ4. **G-I.** Cresta individu tractat amb IDPN 10mM 10 setmanes sense afectació vestibular però amb un 64% de les cèl·lules amb deslocalització de KCNQ4.

Es va portar a terme l'anàlisi de la fluorescència total de Tenascina-C (Fig. R31) a les cèl·lules ciliades amb desaparició de Caspr1, les quals equivalien a les cèl·lules ciliades amb deslocalització de KCNQ4, i a les cèl·lules ciliades sense desaparició de Caspr1, les quals equivalien a les cèl·lules ciliades sense deslocalització de KCNQ4. Les dades obtingudes demostren que les cèl·lules sense desaparició de Caspr1 tenien una quantitat de Tenascina-C igual a les cèl·lules ciliades de tipus I dels controls, mentre que la desaparició de Tenascina-C anava lligada a la desaparició de Caspr1. Aquestes observacions ens reafirmen que la deslocalització de KCNQ4 i la desaparició de Caspr1 i Tenascina-C tenen lloc de manera simultània i cèl·lula a cèl·lula.

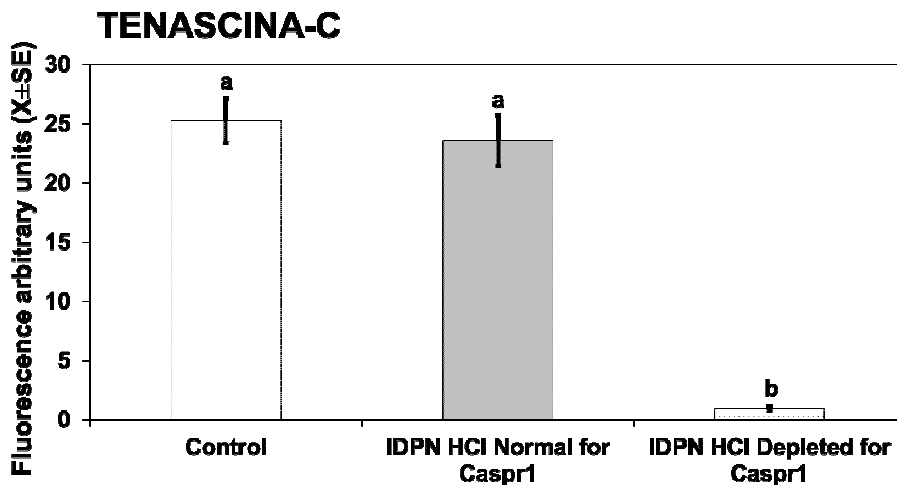


Figura R31. Efecte de l'administració d'IDPN 10mM en la redistribució de KCNQ4 en les cèl·lules ciliades de tipus I (HCl). Representat com l'anàlisi quantitatiu de la fluorescència total de Tenascina-C en les cèl·lules ciliades de tipus I amb desaparició de Caspr1 i en les cèl·lules ciliades de tipus I sense desaparició de Caspr1. (b) Diferències significatives respecte a la mitjana control ($p < 0.05$).

Es van observar diferències estadísticament significatives per Tenascina-C — $F(2,72)=45.2$ i $p=0.000$ —. Les comparacions múltiples (post-hoc, test de Duncan) van demostrar diferències significatives ($p<0.05$) entre els grups control i de cèl·lules ciliades de tipus I sense desaparició de Caspr1 (sense deslocalització de KCNQ4) (a) respecte el grup de cèl·lules ciliades de tipus I amb desaparició de Caspr1 (amb deslocalització de KCNQ4) (b). Això indicava que hi havia una desaparició de Tenascina-C cèl·lula a cèl·lula i que les cèl·lules que encara no es veien afectades per la desaparició d'aquesta presentaven uns nivells de fluorescència equivalents als control, independentment que l'individu tingués altres cèl·lules ciliades afectades.

Aquestes dades exclouen la hipòtesis que Caspr1 i Tenascina-C estan progressivament regulades durant la toxicitat crònica, i donen suport a la hipòtesis que cada calze és estable fins que un esdeveniment, encara per determinar, desencadena el desmantellament de la unió septada.

5.6.3. Efecte de l'IDPN 20mM sobre l'aparell de Neurotransmissió

Fins ara el que s'havia descrit era el comportament de les unions septades de les sinapsis aferents en calze de les cèl·lules ciliades de tipus I quan aquestes eren sotmeses a una exposició subcrònica a IDPN. El següent pas va ser estudiar que passava amb les cintes (*ribbons* en anglès) de les sinapsis aferents de les cèl·lules ciliades de tipus II i de les cèl·lules ciliades de tipus I.

Es van estudiar les sinapsis en cinta, per mitjà de l'estudi del component presinàptic —Ribeye/CtBP2— i els components postsinàptic —PSD-95 i GluR2—. Per tal d'estudiar-ho es va realitzar el marcatge dels diferents tipus d'unitats funcionals amb Calretinina, la qual marca les cèl·lules ciliades de tipus II i els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol, però no marca els calzes de les aferents de tipus dimòrfic. Gràcies a aquest marcatge es va poder estudiar el comportament de les cintes sinàptiques en els tres tipus d'unitats funcionals possibles.

Es van analitzar 10 cèl·lules ciliades de cada tipus/animal x 3 animals de cada un dels grups experimentals, en les que es van quantificar el nombre de cintes completes que hi havia (col·localització o contacte directe entre Ribeye i PSD-95, i entre Ribeye i GluR2), així com el nombre de components presinàptics sols i el nombre de components postsinàptics sols. Es van observar les mostres per microscòpia de fluorescència confocal, on es van establir els ajustos (*settings*) de fluorescència amb les mostres control i es van mantenir en l'adquisició de les mostres tractades i les mostres tractades amb recuperació.

En els individus control (Fig. R32.A-C i Fig. R33.A-C) es va observar com Ribeye donava lloc a un marcatge del component presinàptic observat com a petits puntets vermells a la zona basolateral de les cèl·lules ciliades, així com un marcatge del nucli d'aquestes cèl·lules ciliades, corresponent al factor de transcripció CtBP2; el marcatge del component postsinàptic —PSD-95 o GluR2— s'observava com a petits puntets verds a la zona basolateral de la cèl·lula ciliada; gràcies al marcatge amb Calretinina es van poder distingir les diferents unitats funcionals. El marcatge del nucli causat pel factor de transcripció CtBP2 no es veu modificat per l'ototoxicitat crònica i és molt similar en les tres condicions experimentals. Es va observar que després de l'exposició a IDPN 20mM durant 4 setmanes tant el component presinàptic com els components postsinàptics es veien afectats, amb una disminució del nombre de contactes variable en funció del tipus d'unitat funcional. Es va constatar que aquesta disminució revertia o no després de les 4 setmanes de descans en funció de la unitat funcional i del component postsinàptic considerat —PSD-95 (Fig. R32) i GluR2 (Fig. R33)—.

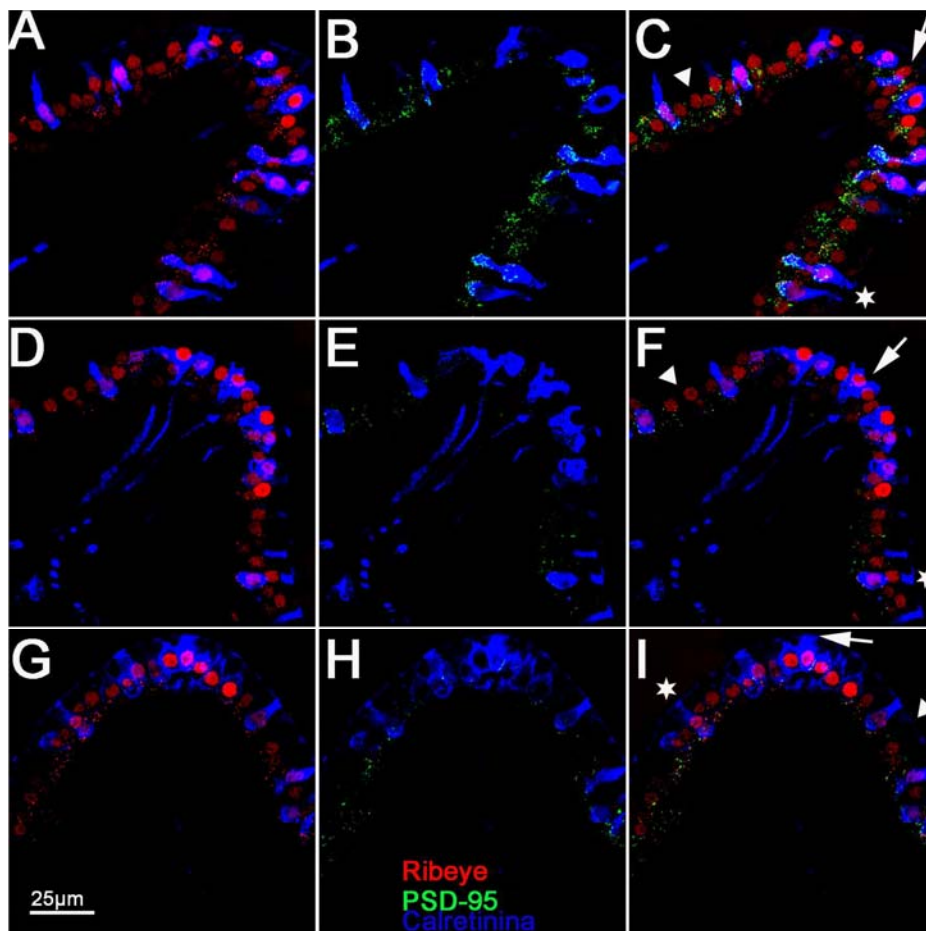


Figura R32. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM durant 4 setmanes en les sinapsis en cinta. Immunohistoquímica de cresta, en verd PSD-95 (anticòs monoclonal clon K28/43 IgG2a de ratolí), en vermell Ribeye (anticòs monoclonal clon 16/CtBP2 IgG1 de ratolí), en blau Calretinina (anticòs policlonal de conill). En groc es mostra la col·localització entre Ribeye i PSD-95. Les fletxes blanques indiquen els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol. Els caps de fletxa blancs mostren els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic. Els asteriscs blancs indiquen les cèl·lules ciliades de tipus II. **A-C.** Cresta individu control. **D-F.** Cresta individu tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes. **G-I.** Cresta individu administrat 4 setmanes amb IDPN 20mM i 4 setmanes de recuperació.

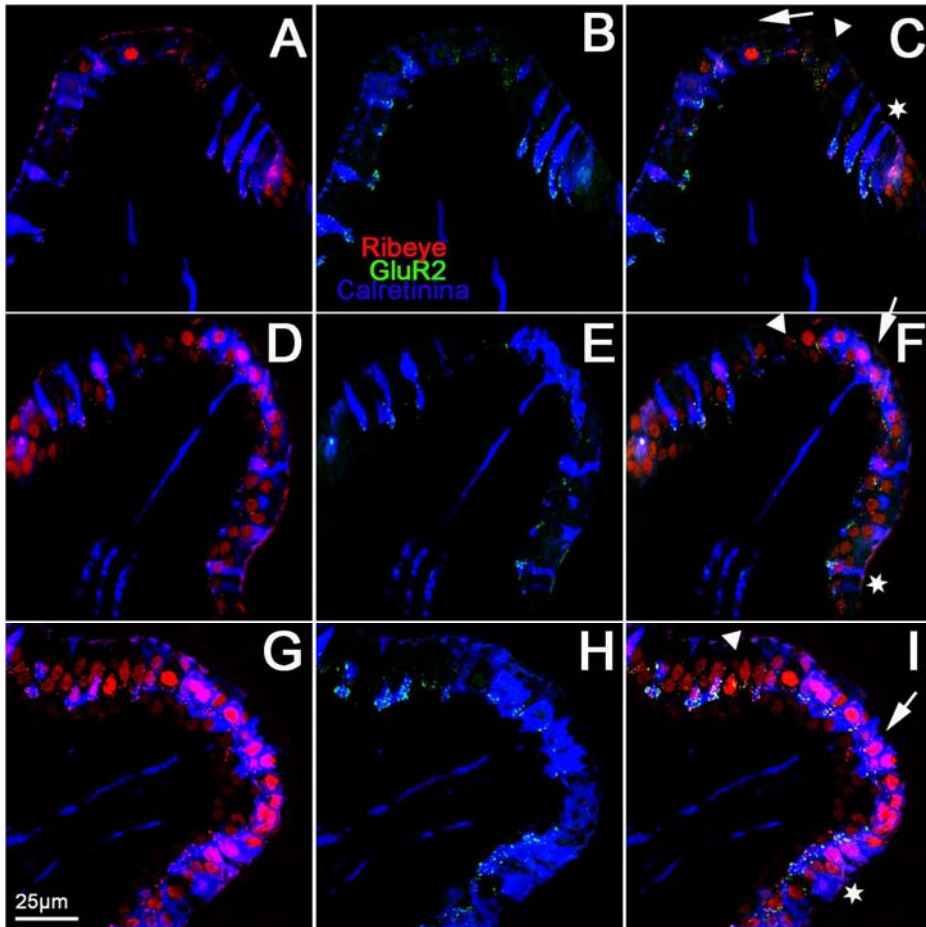


Figura R33. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM durant 4 setmanes en les sinapsis en cinta. Immunohistoquímica de cresta, en verd GluR2 (anticòs monoclonal clon 6C4 IgG2a de ratolí), en vermell Ribeye (anticòs monoclonal clon 16/CtBP2 IgG1 de ratolí), en blau Calretinina (anticòs policlonal de conill). En groc es mostra la col·localització entre Ribeye i GluR2. Les fletxes blanques indiquen els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol. Els caps de fletxa blancs mostren els calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic. Els asteriscs blancs indiquen les cèl·lules ciliades de tipus II. **A-C.** Cresta individu control. **D-F.** Cresta individu tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes. **G-I.** Cresta individu administrat 4 setmanes amb IDPN 20mM i 4 setmanes de recuperació.

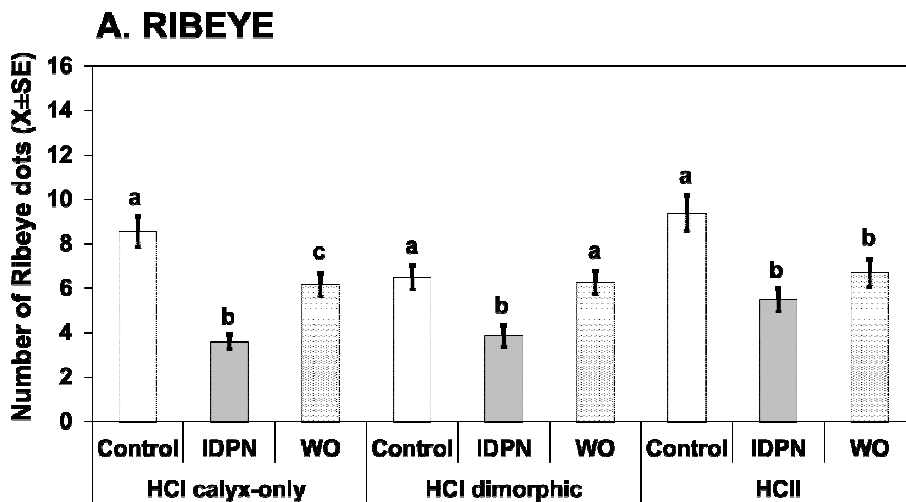
Es van observar diferències estadísticament significatives en els diferents tipus d'unitats funcionals per Ribeye (component presinàptic) (n=60) —cèl·lules ciliades de

tipus I amb aferents de tipus calze sol $F(2,177)=20.8$ i $p=0.000$; cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic $F(2,177)=7.9$ i $p=0.000$; i cèl·lules ciliades de tipus II $F(2,177)=9.0$ i $p=0.000$ —, per PSD-95 (component postsinàptic) ($n=30$) —cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol $F(2,87)=22.2$ i $p=0.000$; cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic $F(2,87)=10.8$ i $p=0.000$; i cèl·lules ciliades de tipus II $F(2,87)=13.4$ i $p=0.000$ — i per les cintes completes (col·localització entre Ribeye i PSD-95) ($n=30$) —cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol $F(2,87)=9.8$ i $p=0.000$; cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic $F(2,87)=4.7$ i $p=0.011$; i cèl·lules ciliades de tipus II $F(2,87)=14.4$ i $p=0.000$ —. Les comparacions múltiples (post-hoc, test de Duncan) van demostrar diferències significatives ($p<0.05$) en el nombre de punts corresponents al contacte presinàptic (Fig. R34.A) entre el grup control (a) i el grup tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (b) en els tres tipus d'unitats funcionals, així com després del període de recuperació de 4 setmanes, es va mostrar una recuperació completa de Ribeye (a) a les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic, una recuperació incompleta (c) a les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol i una no recuperació dels nivells de Ribeye (b) a les cèl·lules ciliades de tipus II. Pel que fa al component postsinàptic PSD-95 (Fig. R34.B), es va poder definir que les diferències eren estadísticament significatives en tots els tipus d'unitats funcionals si es comparava l'administració d'IDPN 20mM durant 4 setmanes (b) amb els controls (a), però només havia una recuperació estadísticament significativa dels nivells de PSD-95, que era després del període de descans a les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol (c) i no arribava als nivells dels controls, a les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic i a les cèl·lules ciliades de tipus II no s'observava recuperació (b). Si ens centrem en les cintes completes (Fig. R34.C), les diferències observades entre el grup tractat (b) i el grup control (a) eren estadísticament significatives, tot i que després del període de recuperació tot i observar-se un increment en el nombre de cintes, la recuperació no arribava a ser estadísticament significativa en cap tipus de cèl·lula ciliada (b).

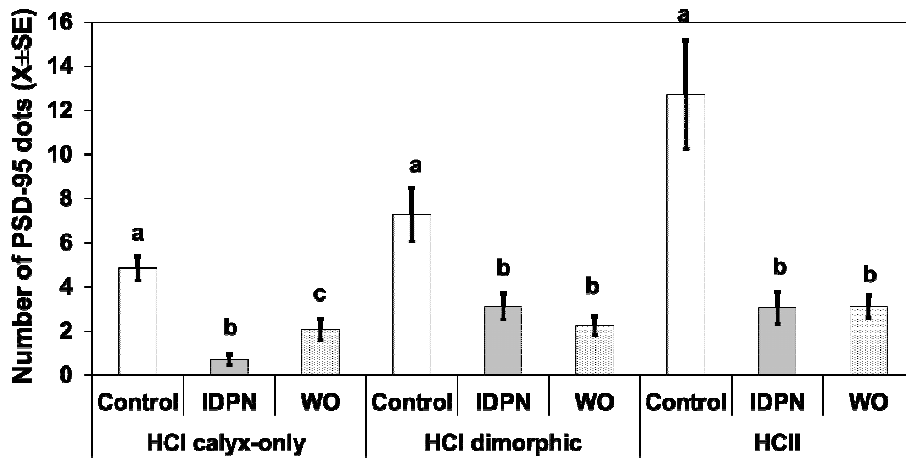
Pel que fa al segon component postsinàptic estudiat —GluR2—, només es van observar diferències estadísticament significatives en les cèl·lules ciliades de tipus I

calze sol tant per GluR2 (Fig. R34.D) ($n=30$) —cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol $F(2,87)=4.99$ i $p=0.009$; cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic $F(2,87)=0.291$ i $p=0.748$; i cèl·lules ciliades de tipus II $F(2,87)=0.2$ i $p=0.819$ — com per les cintes completes (col·localització entre Ribeye i GluR2) (Fig. R34.E) ($n=30$) —cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol $F(2,87)=5.51$ i $p=0.006$; cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfic $F(2,87)=0.44$ i $p=0.645$; i cèl·lules ciliades de tipus II $F(2,87)=1.47$ i $p=0.235$ —. Les comparacions múltiples (post-hoc, test de Duncan) van demostrar diferències significatives ($p<0.05$) entre el grup control (a) i el grup tractat amb IDPN 20mM durant 4 setmanes (b) a les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus calze sol i una no recuperació dels nivells de GluR2 (b) ni de cintes completes en aquestes mateixes cèl·lules.

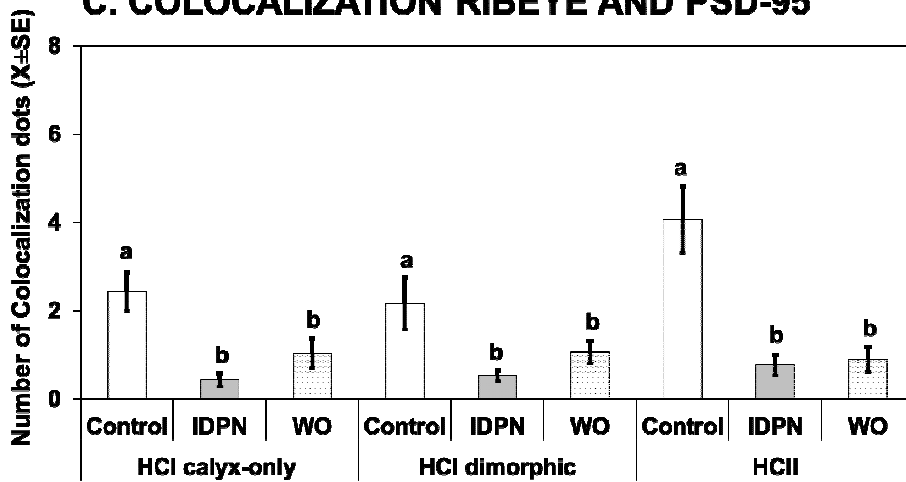
Les dades obtingudes demostren que, dins de les alteracions causades per l'ototoxicitat crònica a les aferències de les cèl·lules ciliades de tipus I, també s'inclouen les alteracions que tenen lloc a la maquinària sinàptica de tots dos tipus de cèl·lules ciliades de tipus I i a les cèl·lules ciliades de tipus II. Els resultats demostraven que la reparació fins a nivells control no s'assoleix en el mateix període de temps en el que s'ha observat que s'assoleix la recuperació completa de les unions septades.



B. PSD-95



C. COLOCALIZATION RIBEYE AND PSD-95



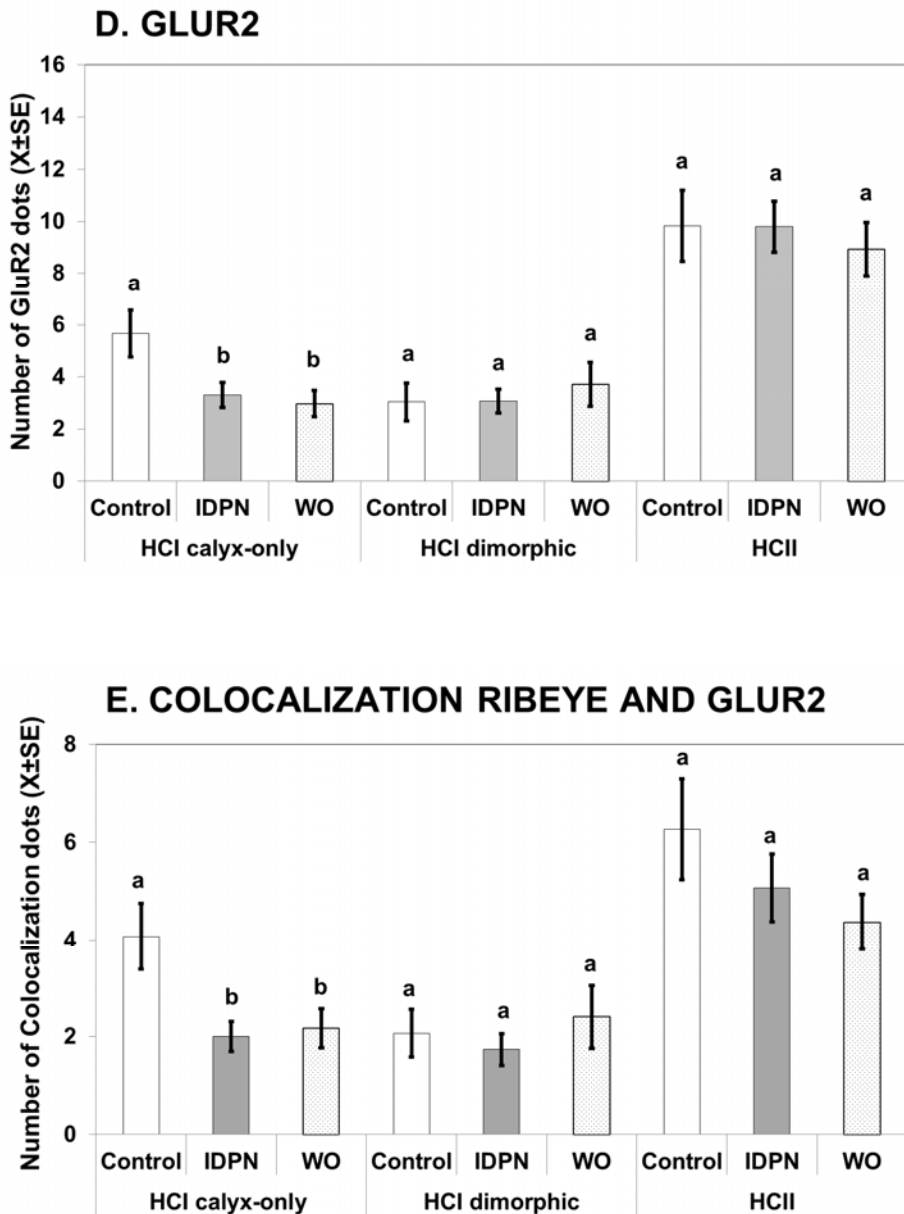


Figura R34. Efecte de l'administració d'IDPN 20mM en els diferents tipus d'unitats funcionals. Representat com l'anàlisi quantitatiu del nombre de punts. (b), (c) Diferències significatives respecte a la mitjana control (a) ($p < 0.05$). **A.** Nombre de punts de Ribeye observats en $n=60$ cèl·lules. **B.** Nombre de punts de PSD-95 observats en $n=30$ cèl·lules **C.** Nombre de col·localitzacions (Ribeye+PSD-95) observades en $n=30$ cèl·lules. **D.** Nombre de punts de GluR2 observats en $n=30$ cèl·lules. **E.** Nombre de col·localitzacions (Ribeye+GluR2) observades en $n=30$ cèl·lules.

6. DISCUSSIÓ

En els últims anys el nostre laboratori s'ha centrat en la investigació dels nitrils entre ells l'IDPN. Un dels objectius principals del nostre laboratori és avançar en el coneixement del dany i la possible reparació de la funció vestibular, associats amb la toxicitat crònica i la posterior recuperació. I és en aquest marc en el que s'han desenvolupat diversos treballs.

6.1. Model Animal

Els mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en el dany vestibular crònic i la seva possible reparació no estan suficientment estudiats. La recerca que s'ha dut a terme en fisiopatologia de l'oïda interna s'ha centrat en els compostos ototòxics clínicament importants: els antibiòtics aminoglicòsids i el cisplatí —fàrmac antineoplàsic— (Rybak & Whitworth, 2005; Schacht *et al.*, 2012). Mentre que hi ha evidències convincents demostrant que aquests agents causen degeneració selectiva de les cèl·lules ciliades dels mamífers, de la línia lateral dels peixos zebra i d'altres cèl·lules mecanoreceptores *in vitro*, en les que desencadenen vies apoptòtiques i no apoptòtiques (Cheng *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2010; Warchol, 2010; Schacht *et al.*, 2012), es sap molt poc sobre la resposta que presenta l'epiteli sensorial sota atacs ototòxics crònics *in vivo*. Els avanços en aquesta àrea de recerca s'han vist obstaculitzats, al menys en part, per la limitada flexibilitat dels models d'ototoxicitat crònica d'aminoglicòsids (revisat per Sedó-Cabezón *et al.*, 2014), ja que les rates i els ratolins són particularment resistent al dany de l'oïda interna induït per l'administració d'antibiòtics aminoglicòsids o de cisplatí, i això ha encallat la comprensió de la resposta que mostren els epitelis sensorials de l'orella a aquesta toxicitat.

La recerca en models animals ha demostrat que un nombre de nitrils de baix pes molecular (al·lilnitril, cis-crotononitril, trans-crotononitril i IDPN) causen efectes ototòxics semblants als coneguts pels antibiòtics aminoglicòsids, incloent la inducció de la degeneració de les cèl·lules ciliades de l'oïda interna (Berg, 1951; Wersäll & Hawkins, 1962; Lindeman, 1969a, 1969b), però amb una millor relació ototoxicitat/mortalitat en rates i ratolins (Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Boades-

Vaello *et al.*, 2005; Saldaña-Ruíz *et al.*, 2012, 2013; Rúa *et al.*, 2013). El nitril ototòxic prototip, el 3,3'-iminodipropionitril (IDPN), ha demostrat que causa degeneració de les cèl·lules ciliades vestibulars en una varietat de models d'exposició i que és altament efectiu en rates i ratolins (Llorens *et al.*, 1993; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001a, 2001b; Soler-Martín *et al.*, 2007). Encara que en humans no es dóna exposició a l'IDPN, les propietats ototòxiques que aquest causa en els animals de laboratori fan que s'ajusti al patró ototòxic definit pels antibiòtics aminoglicòsids (Saldaña-Ruíz *et al.*, 2013, i referències en el mateix).

La síndrome comportamental permanent causada per l'exposició aguda a IDPN s'ha observat en diverses espècies animals i està associada amb la degeneració de les cèl·lules ciliades vestibulars com s'ha demostrat en la rata, el ratolí, el conill d'índies i la granota (Soler-Martín *et al.*, 2007). En treballs anteriors s'ha descrit que les rates exposades a IDPN crònic via l'aigua de beguda desenvolupen una progressiva pèrdua de la funció vestibular (Llorens & Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001a, 2001b). El model d'ototoxicitat crònic de l'IDPN via l'aigua de beguda en rata desenvolupa una progressiva pèrdua de la funció vestibular associada amb el procés de mort per extrusió de les cèl·lules ciliades des de l'epiteli cap a la cavitat endolimfàtica (Seoane *et al.*, 2001a). En aquest model, es va observar que les terminals aferents de tipus calze de les cèl·lules ciliades de tipus I se separaven, retreien i fragmentaven abans que tingués lloc l'extrusió de les cèl·lules ciliades (Seoane *et al.*, 2001b).

En estudis previs del grup de treball s'havia observat que si s'aturava l'exposició a IDPN a les rates, en intoxicació crònica, que ja patien una evident pèrdua de funció es podia produir una recuperació funcional. Es va hipotetitzar que la reparació de les aferències tenia lloc després de la interrupció de l'exposició, i que la pèrdua funcional i la recuperació estaven associades amb el dany i reparació de les aferències. És per aquest motiu que en aquest treball es van estudiar el comportament i els efectes estructurals i moleculars causats per l'exposició crònica a l'IDPN 10 i 20mM durant 4, 6 i 10 setmanes seguida de la interrupció per permetre la reparació fisiològica. Les dades obtingudes demostren que la pèrdua inicial de funció és reversible. Els resultats obtinguts indiquen que per mitjà de l'ototoxicitat crònica es pot assolir una marcada

disfunció vestibular en associació amb el dany aferent, abans que tingui lloc un dany significatiu en els feixos ciliars o bé tingui lloc la mort de les cèl·lules ciliades per extrusió, i que la reparació aferent està associada amb la recuperació comportamental. Els experiments realitzats van permetre concloure que l'administració subcrònica d'IDPN 20mM provocava una significativa disfunció vestibular, que aquesta disfunció recuperava completament si s'aturava l'administració a les quatre setmanes, però no recuperava completament si l'administració perdurava en el temps; també van permetre concloure que la dosi de 10mM no provocava disfunció vestibular. En conjunt, es van establir les relacions dosi-efecte i temps-efecte de la toxicitat vestibular causada per l'IDPN crònic.

En resum, de les característiques generals i el comportament dels animals es pot concloure que l'IDPN crònic causa toxicitat vestibular a les rates. A més a més, es pot afirmar que la toxicitat vestibular reverteix completament en la major part d'animals quan s'atura l'exposició en un determinat punt. Aquestes observacions indiquen que hi ha processos de dany i recuperació que són lents, per tant podria ser la diana terapèutica d'elecció per bloquejar la progressió del dany abans que tinguin lloc els efectes irreversibles.

6.2. Ultraestructura

Els estudis d'exposició amb animals han demostrat clarament que els compostos ototòxics poden causar incapacitat permanent deguda a la degeneració de la majoria o de totes les cèl·lules ciliades, ja que aquestes cèl·lules no poden regenerar, o ho fan de manera limitada en la majoria d'espècies de mamífers (Llorens *et al.*, 1993; Forge & Schacht, 2000; Groves, 2010; Rubel *et al.*, 2013). No obstant, en alguns casos, la disfunció vestibular apareix progressivament com a resultat d'un lleu però persistent estrès del sistema. Si l'estrès s'atura, els símptomes poden persistir completament, o disminuir fins una recuperació completa o incompleta (Black *et al.*, 2001, 2004).

Està fermament establert que les cèl·lules ciliades de la còclea i del vestíbul regeneren després d'un dany en peixos, amfibis i ocells (Corwin & Cotanche, 1988; Weisleder & Rubel, 1992, 1993; Baird *et al.*, 1993), i que aquestes cèl·lules ciliades regenerades contacten amb terminals aferents i eferents (Ryals & Westbrook, 1994; Masetto & Correia, 1997b; Hennig & Cotanche, 1998). A més a més, la recuperació funcional de les cèl·lules ciliades vestibulars (Masetto & Correia, 1997a), la sensibilitat aferent al moviment (Li & Correia, 1998; Boyle *et al.*, 2002) i les respostes del comportament vestibular (Jones & Nelson, 1992; Carey *et al.*, 1996; Goode *et al.*, 1999; Dickman & Lim, 2004) correlacionen amb el desenvolupament regeneratiu en els ocells. No obstant, es coneix poc sobre el procés de reinnervació i si les aferents regenerades desenvolupen terminacions normals.

Els compostos ototòxics que causen pèrdua de les cèl·lules ciliades en els sistemes vestibular i auditiu són probablement bastant selectius per aquestes cèl·lules, on sovint activen vies apoptòtiques, encara que també activen altres vies de mort cel·lular, incloent la necrosis. Les neurones ganglionars també són una diana d'aquesta toxicitat i l'extensió del seu dany pot ser degut a una toxicitat directa o a una conseqüència secundària de la pèrdua de les cèl·lules ciliades, el que pot dependre del model particular d'exposició. Les dades disponibles dels models d'exposició crònica a dosi baixa indiquen que hi ha patrons més complexos de mort de les cèl·lules ciliades i dany de les neurones aferents que podrien tenir lloc, i que no es coneixen gaire. L'administració d'IDPN 20mM de manera crònica a l'aigua de beguda provoca en fases molt avançades d'afectació comportamental la mort de les cèl·lules ciliades per extrusió des de la superfície luminal (Seoane *et al.*, 2001a, 2001b), que és un dels tres tipus de mort de les cèl·lules ciliades dels mamífers que es deu a models d'agressió crònica de baixa intensitat (Seoane & Llorens, 2005), com és el cas. Els efectes d'exposicions cròniques a dosis baixes són més rellevants a la població humana amb el possible paper de l'exposició ototòxica en la pèrdua sensorial que s'observa amb l'edat. Aquests esforços d'investigació són necessaris per entendre el paper fisiològic i els mecanismes molecular de l'extrusió de les cèl·lules ciliades així com el possible paper que l'excitotoxicitat té en els processos d'ototoxicitat crònica (revisat per Sedó-Cabezón *et al.*, 2014).

Les dades obtingudes per microscòpia electrònica de rastreig, dels epitelis dels animals administrats amb IDPN 10 i 20mM per aigua de beguda durant 4, 6 i 10 setmanes seguit de la interrupció per permetre la reparació fisiològica, van demostrar que si s'aturava el període d'exposició a IDPN 20mM a les 4 setmanes no tenia lloc l'extrusió de les cèl·lules ciliades, però si aquesta exposició persistia en el temps tenia lloc l'extrusió descrita en fases molt avançades d'afectació comportamental (Seoane *et al.*, 2001a, 2001b). Tampoc es va observar extrusió de les cèl·lules ciliades en els individus administrats amb IDPN 10mM durant 10 setmanes. Totes aquestes dades ens van permetre concloure que hi havia una relació directa entre el grau de disfunció vestibular i el dany histològic a les cèl·lules ciliades, sent les 4 setmanes d'intoxicació amb IDPN 20mM el punt d'inflexió inicial per a l'extrusió de les cèl·lules ciliades vestibulars.

Per mitjà de les dades obtingudes per microscòpia electrònica de transmissió es pot demostrar que a les 4 setmanes de tractament amb IDPN 20mM, abans que s'iniciï l'extrusió de les cèl·lules ciliades, hi ha una pèrdua de la connexió de la cèl·lula ciliada amb la neurona aferent per mitjà de la pèrdua de la unió septada, la qual provoca la fragmentació del calze de les cèl·lules ciliades de tipus I, i només en les mostres dels animals més afectats comportamentalment es va observar un estadi inicial de coalescència ciliar. Després del període de descans de 4 setmanes posterior a les 4 setmanes d'administració amb IDPN 20mM es va observar una recuperació comportamental completa i es va poder comprovar com les unions septades revertien gaire bé per complet i com els calzes tornaven a la posició correcta. Les dades obtingudes en els individus administrats amb IDPN 10mM durant 10 setmanes ens permeten afirmar que aquesta pèrdua de la connexió entre la neurona aferent i la cèl·lula ciliada de tipus I s'inicia abans que els individus presentin disfunció vestibular. Amb aquestes dades podem establir que el desmantellament de les unions septades és un esdeveniment previ a la fragmentació dels calzes aferents, que la pèrdua de la funció vestibular està associada a efectes previs al procés d'extrusió, i que quan s'atura la intoxicació en un moment concret aquestes lesions són reversibles. A diferència del que s'havia observat prèviament (Seoane *et al.*, 2001b), es va constatar que els calzes fragmentats no estaven inflats, aquesta observació va permetre establir que la

fragmentació no és una conseqüència secundària a la inflamació; aquesta inflamació s'ha pogut evitar gràcies a la major rapidesa en la fixació dels epitelis.

Els resultats d'aquest estudi demostren que, en estadis inicials d'ototoxicitat crònica, té lloc una pèrdua significativa de la funció vestibular abans que s'observin evidències a nivell ultraestructural de pèrdua de les cèl·lules ciliades o de dany en els estereocilis. Una recuperació completa de la funció vestibular, de l'estructura del calze i de les unions septades és possible en aquells animals que no tenen una pèrdua significativa de les cèl·lules ciliades ni coalescència dels estereocilis. Períodes més llargs d'exposició incrementen la possibilitat d'una disfunció persistent amb major pèrdua de les cèl·lules ciliades i dany en els feixos ciliars. Aquests resultats poden tenir implicacions terapèutiques i constituir un nova diana pel tractament dels trastorns vestibulars.

6.3. Caracterització Molecular

Els esdeveniments que tenen lloc durant la lesió progressiva causada per l'ototoxicitat crònica romanen desconeguts. Es requereix més recerca en aquests canvis moleculars durant la disfunció vestibular, ja que conèixer els esdeveniments involucrats en el procés de dany i reparació és de gran interès per diverses raons. 1) El procés de dany lent podria ser una diana terapèutica d'elecció dirigida a bloquejar el dany progressiu abans que tinguin lloc els esdeveniments irreversibles, i proporcionar d'aquesta manera informació de en quin moment una lesió ototòxica pot passar de ser reversible a no ser-ho. 2) El procés de recuperació podria ser una diana d'intervenció terapèutica dirigida a disminuir el temps de recuperació o a millorar els resultats finals del procés, per exemple, fent que la recuperació parcial millori o que recuperi completament. 3) Els mecanismes de dany lent són els únics probablement involucrats en les pèrdues sensorials comunament associades amb l'edat; mentre que la presbiacúsia (pèrdua auditiva relacionada amb l'edat) és un fenomen àmpliament reconegut, la pèrdua de la funció vestibular relacionada amb l'edat es coneix molt menys tot i tenir una incidència molt semblant i constituir un important factor de risc per a les caigudes

(Agrawal *et al.*, 2009; Ishiyama, 2009). 4) El coneixement dels esdeveniments que tenen lloc durant el dany i la reparació indubtablement ens guiaria en els processos bàsics que intervenen en la fisiologia i l'homeòstasi del sistema.

L'estructura i composició proteica de les cèl·lules ciliades són molt importants pel seu manteniment, i és per aquest motiu que el nostre estudi es basa en que la pèrdua d'algunes proteïnes de la unió septada, deguda a la toxicitat dels nitrils, pot causar l'extrusió de les cèl·lules ciliades de tipus I. Les avaluacions portades a terme per microscòpia electrònica de transmissió dels animals administrats amb IDPN 20mM durant 4 setmanes, que presentaven elevades disfuncions vestibulars però no mostraven anormalitats significatives en els estereocilis, van revelar una evident pèrdua de les unions septades. Per mitjà de les dades obtingudes per immunohistoquímica dels epitelis dels individus exposats a IDPN 10 i 20mM durant 4, 6 i 10 setmanes seguit de la interrupció per permetre la reparació fisiològica, es va poder deduir que hi havia una clara correlació entre la disfunció vestibular a nivell comportamental, a nivell estructural i a nivell molecular. D'acord amb les observacions ultraestructurals, els resultats obtinguts per microscòpia confocal dels epitelis de 20mM durant 4 setmanes, mostrava que a major afectació vestibular tenia lloc una major afectació molecular amb desaparició de Caspr1 —nucli de les unions septades— (Sousa *et al.*, 2009); reorganització de KCNQ4 a la cara externa del calze degut a l'absència de Caspr1 —encarregada de la reclusió i retenció del canal de potassi—, és una distribució anormal per aquest canal i coincideix amb la distribució anormal que té lloc en els ratolins *Knock Out* per Caspr1, els quals no tenen unions septades (Sousa *et al.*, 2009); desaparició de Tenascina-C —proteïna de matriu extracel·lular—; i reorganització i desaparició dels neurofilaments a la zona apical (Seoane *et al.*, 2003). Quan s'aturava l'administració d'IDPN hi tornava a haver una bona col·localització entre Caspr1, Tenascina-C i KCNQ4 (Sousa *et al.*, 2009) i una correcta presència dels neurofilaments, el que demostrava que durant la intoxicació hi havia afectació de les proteïnes implicades en la unió septada, però que si aquesta intoxicació s'aturava a les 4 setmanes era reversible. Tot això permet concloure que el dany de les unions septades i de la proteïna de matriu extracel·lular es repara quan s'atura l'exposició ototòxica, i que aquesta recuperació està associada amb les recuperacions comportamental i estructural.

Una pista del que està passant a les unions septades es va obtenir per mitjà de l'observació dels epitelis dels animals exposats durant 10 setmanes a IDPN 10mM. Les dades obtingudes ens indiquen que aquesta pèrdua i deslocalització de les proteïnes implicades en la unió septada té lloc abans que es pugui apreciar disfunció vestibular en els animals. Aquests epitelis no mostraven una disminució moderada de Caspr1 i Tenascina-C en tots els calzes, sinó que s'observaven calzes amb desaparició de Caspr1 i Tenascina-C i calzes equivalents als controls pel que feia a la presència de Caspr1 i Tenascina-C, la qual cosa indica que es desencadena un procés actiu de desmantellament cèl·lula a cèl·lula com ja s'havia anticipat per mitjà de la microscòpia electrònica de transmissió, el que ens permet deduir que hi ha un mecanisme que activa la lesió cèl·lula a cèl·lula. És important remarcar que aquestes observacions fan que sigui improbable que això sigui degut a l'efecte deleteri de l'IDPN en el transport dels neurofilaments (Griffin *et al.*, 1978), el qual està associat amb la inflamació de l'axó proximal (Chou & Hartmann, 1964) i la reducció dels neurofilaments a les terminals, incloent les terminals de les motoneurons (Soler-Martín *et al.*, 2012, 2014) i les terminals aferents vestibulars (Seoane *et al.*, 2005). A més a més, aquests resultats poden explicar algunes observacions clíniques que indiquen que quan s'atura la intoxicació els símptomes disminueixen donant lloc a una recuperació completa o incompleta (Black *et al.*, 2001, 2004).

Es va estudiar el desacoblament sinàptic —pèrdua dels punts actius de les sinapsis— per tal d'explicar la pèrdua de la funció vestibular, és per aquest motiu que es va estudiar l'aparell de neurotransmissió de les diferents unitats funcionals —cèl·lula ciliada de tipus I amb aferent de tipus calze sol, cèl·lula ciliada de tipus I amb aferent de tipus dimòrfic i cèl·lula ciliada de tipus II—. Es va observar a les 4 setmanes d'administració amb IDPN 20mM com la disfunció vestibular es correlacionava amb una significativa pèrdua de les sinapsis vestibulars, com s'ha constatat per mitjà del marcatge amb Ribeye —component presinàptic— i PSD-95 i GluR2 —components postsinàptics—. Els resultats obtinguts demostren que el desmantellament de la unió septada va acompanyat de la pèrdua en la densitat de les sinapsis, i que aquesta pèrdua de sinapsis es produeix també en les sinapsis en botó de les cèl·lules ciliades de tipus II. Per contra, es va observar una discrepància en els resultats de recuperació, ja que tenia

lloc una escassa recuperació del nombre de sinapsis, fet que contrastava amb la pràcticament completa recuperació de les unions septades i la recuperació funcional dels animals. Els nostres resultats van demostrar que la reparació de les estructures sinàptiques no té lloc paral·lelament amb la reparació de les unions septades, ja que després del període de recuperació es va observar un increment en el nombre de punts de Ribeye en les cèl·lules ciliades de tipus I però aquest increment no es va observar en les cèl·lules ciliades de tipus II. Aquests resultats indiquen que les estructures sinàptiques estan sota una regulació diferent de la que té lloc en la recuperació de l'estructura del calze i de les unions septades. En estudis futurs caldrà abordar si aquesta pèrdua de sinapsis és transitòria i només cal més temps per a la seva recuperació, o bé constitueix una lesió subclínica persistent.

6.4. Conclusió

Tots aquests resultats, van permetre corroborar les conclusions inicials obtingudes per microscòpia electrònica, i afirmar que la pèrdua de les proteïnes constitutives i la distribució anormal dels components sinàptics estan associats amb la disfunció vestibular, i que tots aquests processos tenen lloc abans de l'extrusió de les cèl·lules ciliades mostrat per microscòpia electrònica de rastreig. Aquest treball descriu el dany sinàptic i aferent, així com el fenomen de reparació associat amb la toxicitat vestibular crònica i la subseqüent recuperació després de la fi de l'exposició.

La relació exacta entre les alteracions moleculars, estructurals i la disfunció comportamental no està clara. Per una banda, té lloc una gran pèrdua d'unions septades i d'estructures sinàptiques, en els animals administrats amb IDPN 20mM durant 4 setmanes amb valors intermedis de disfunció vestibular (VDR 12-17), acompanyada d'estructures ciliars intactes; així com, una completa recuperació comportamental, després de 4 setmanes de recuperació, en els animals que presentaven una major pèrdua en les estructures sinàptiques. Per altra banda, es va observar una significativa pèrdua de les unions septades en els animals exposats durant 10 setmanes a IDPN 10mM, els quals no mostraven simptomatologia vestibular. Es pot hipotetitzar que hi ha una manca de

sensibilitat en la puntuació dels tests de disfunció vestibular, ja que no revela els dèficits funcionals més subtils dels animals administrats 10 setmanes amb IDPN 10mM, en els quals existeix pèrdua de les unions septades que no es detecta per avaluació comportamental. La completa recuperació de les unions septades contrasta amb l'escassa recuperació dels elements sinàptics. No obstant, la relació que hi ha entre els fenòmens observats i el dèficit comportamental encara no s'ha establert, nosaltres hipotetitzem que aquestes observacions són rellevants pels casos clínics on hi ha recuperació completa després de la disfunció vestibular causada per danys ototòxics crònics.

La conclusió final que se'n deriva és que el dany aferent precedeix a l'extrusió cel·lular durant l'ototoxicitat crònica, i que la recuperació molecular i estructural estan associades amb la recuperació comportamental. Es pot hipotetitzar que el fenomen descrit pot estar involucrat de manera general en una disminució o manteniment de la funció vestibular sotmès a qualsevol tipus d'estrès o durant l'envelliment. El model establert permet per primer cop estudiar els fenòmens de dany vestibular crònic i pot proporcionar en estudis futurs molta més informació sobre els processos implicats en el dany i les respostes reparatives dels epitelis vestibulars.

Gràcies als resultats i conclusions obtinguts amb aquest estudi, el nostre laboratori vam decidir extrapol·lar els experiments en el model animal de ratolí, ja que el ratolí és el model més utilitzat en recerca biomèdica gràcies a la gran quantitat de transgènics i *Knock Outs* que existeixen. Les dades obtingudes fins al moment ens permeten corroborar que, al menys, pel que fa a l'afectació comportamental i molecular de les unions septades s'observa el mateix que hem caracteritzat en rata. Queda encara per veure l'afectació molecular de les estructures sinàptiques i l'afectació estructural de les cèl·lules ciliades i de les unions septades de les cèl·lules ciliades de tipus I.

7. CONCLUSIONS

Per mitjà d'aquest estudi s'han pogut caracteritzar els canvis comportamentals, ultraestructurals i moleculars que tenen lloc a la rata durant la toxicitat vestibular *in vivo* amb IDPN a l'aigua de beguda, així com després del període de recuperació.

1. L'administració d'IDPN (3,3'-iminodipropionitril) subcrònic per mitjà de l'aigua de beguda ocasiona una disminució del pes corporal dels animals.
2. L'IDPN causa ototoxicitat dosi dependent a la rata, que es posa de manifest per mitjà de l'alteració de la funció vestibular. A mesura que s'allarga el temps d'exposició a l'IDPN s'incrementa el grau de disfunció vestibular.
3. Té lloc una bona correlació entre la dosi efectiva a nivell comportamental i a nivell patològic. La pèrdua de la funció vestibular està associada a la pèrdua de la unió septada, seguida de la fragmentació del calze en les cèl·lules ciliades de tipus I, efectes que precedeixen a la pèrdua de cèl·lules ciliades pel procés d'extrusió.
4. Quan s'atura l'exposició d'IDPN té lloc la recuperació de la funció vestibular, la recuperació de les unions septades i la recuperació dels calzes aferents a les cèl·lules ciliades de tipus I.
5. Les unions septades dels calzes vestibulars de les cèl·lules ciliades de tipus I són estructures altament sensibles a la intoxicació subcrònica per IDPN, presentant desaparició de les molècules d'adhesió —Caspr1 i KCNQ4— i de matriu extracel·lular —Tenascina-C—.
6. La reparació dels calzes després del període de descans —amb recuperació de les proteïnes d'adhesió i de matriu extracel·lular i recuperació ultraestructural de les unions septades i dels calzes— està associada amb la recuperació comportamental.

7. L'IDPN provoca la pèrdua dels neurofilaments a les terminals aferents de l'epiteli vestibular en els animals administrats amb IDPN. Després del període de descans s'observa recuperació dels neurofilaments.
8. La intoxicació per IDPN causa afectació a nivell de l'aparell de neurotransmissió, presentant desaparició del component presinàptic —Ribeye— i dels components postsinàptics —PSD-95 i GluR2— en totes les unitats funcionals (calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol, calzes de les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de tipus dimòrfics i cèl·lules ciliades de tipus II).
9. La reparació de l'aparell de neurotransmissió després del període de descans no és completa i depèn de la unitat funcional i dels components pre i postsinàptics considerats.
10. Aquest model permetrà proporcionar, en estudis futurs, molta més informació sobre els processos implicats en el dany i les respostes reparatives dels epitelis vestibulars.

8. BIBLIOGRAFIA

A

Adler HJ, Raphael Y. 1996. New hair cells arise from supporting cell conversion in the acoustically damaged chick inner ear. *Neurosci Lett*. 1996 Feb 16;205(1):17-20.

Agrawal Y, Carey JP, Della Santina CC, Schubert MC, Minor LB. 2009. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2004. *Arch Intern Med*. 2009;169:938–44.

Ahmed AE, Farooqui MY. 1982. Comparative toxicities of aliphatic nitriles. *Toxicol Lett*. 1982 Jul;12(2-3):157-63.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995 Oct;15(4):961-73.

Aran JM, Erre JP, Guilhaume A, Arousseau C. 1982. The comparative ototoxicities of gentamicin, tobramycin and dibekacin in the guinea pig. A functional and morphological cochlear and vestibular study. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1982;390:1-30.

B

Baird RA, Desmadryl G, Fernández C, Goldberg JM. 1988. The vestibular nerve of the chinchilla. II. Relation between afferent response properties and peripheral innervation patterns in the semicircular canals. *J Neurophysiol*. 1988 Jul;60(1):182-203.

Baird RA, Torres MA, Schuff NR. 1993. Hair cell regeneration in the bullfrog vestibular otolith organs following aminoglycoside toxicity. *Hear Res*. 1993 Feb;65(1-2):164-74.

Balbuena E, Llorens J. 2001. Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res*. 2001 Jun 22;904(2):298-306.

Balbuena E, Llorens J. 2003. Comparison of cis- and trans-crotononitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 Mar 1;187(2):89-100.

Baloh RW. 2001. Prosper Ménière and his disease. *Arch Neurol.* 2001 Jul;58(7):1151-6.

Banerjee A, Parnes LS. 2004. The biology of intratympanic drug administration and pharmacodynamics of round window drug absorption. *Otolaryngol Clin North Am.* 2004 Oct;37(5):1035-51.

Barone S Jr, Herr DW, Crofton KM. 1995. Effects of 3,3'-iminodipropionitrile on the peripheral structures of the rat visual system. *Neurotoxicology.* 1995 Fall;16(3):451-67.

Bartual-Pastor J. 2005. Vestibular neuritis: etiopathogenesis. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord).* 2005;126(4):279-81.

Bats C, Groc L, Choquet D. 2007. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron.* 2007 Mar 1;53(5):719-34.

Berg K. 1951. The toxic effect of streptomycin on the vestibular and cochlear apparatus; an experimental study on cats. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1951;97:1-77.

Bitner-Glindzicz M, Osei-Lah V, Colvin I, Sirimanna T, Lucas D, Mac Ardle B, Webb D, Shankar A, Kingston J, Jenkins L, Rahman S. 2010. Aminoglycoside-induced deafness during treatment of acute leukaemia. *Arch Dis Child.* 2010 Feb;95(2):153-5.

Black FO, Gianna-Poulin C, Pesznecker SC. 2001. Recovery from vestibular ototoxicity. *Otol Neurotol.* 2001 Sep;22(5):662-71.

Black FO, Pesznecker S, Stallings V. 2004. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otol Neurotol.* 2004 Jul;25(4):559-69.

Boadas-Vaello P, Riera J, Llorens J. 2005. Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol Sci.* 2005 Dec;88(2):456-66.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 1;92(16):7162-6.

Bonsacquet J, Brugeaud A, Compan V, Desmadryl G, Chabbert C. 2006. AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *J Physiol*. 2006 Oct 1;576(Pt 1):63-71.

Boyle R, Highstein SM, Carey JP, Xu J. 2002. Functional recovery of anterior semicircular canal afferents following hair cell regeneration in birds. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2002 Jun;3(2):149-66.

C

Campo P, Morata TC, Hong O. 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis Mon*. 2013 Apr;59(4):119-38.

Carey JP, Fuchs AF, Rubel EW. 1996. Hair cell regeneration and recovery of the vestibuloocular reflex in the avian vestibular system. *J Neurophysiol*. 1996 Nov;76(5):3301-12.

Carpenter S. 1968. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology*. 1968 Sep;18(9):841-51.

Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*. 2000 Dec 21-28;408(6815):936-43.

Chen JW, Eatock RA. 2000. Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. *J Neurophysiol*. 2000 Jul;84(1):139-51.

Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. 2005. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13:343-8.

Chiu LL, Cunningham LL, Raible DW, Rubel EU, Ou HC. 2008. Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2008 Jun;9(2):178-90.

Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB. 1992. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*. 1992 Nov;9(5):929-42.

Chou SM, Hartmann HA. 1964. Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. With a concept--"axostasis". *Acta Neuropathol*. 1964 May 5;3:428-50.

Coleman SK, Cai C, Mottershead DG, Haapalahti JP, Keinänen K. 2003. Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein. *J Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):798-806.

Collado MS, Burns JC, Meyers JR, Corwin JT. 2011. Variations in shape-sensitive restriction points mirror differences in the regeneration capacities of avian and mammalian ears. *PLoS One*. 2011;6(8):e23861.

Corwin JT, Cotanche DA. 1988. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science*. 1988 Jun 24;240(4860):1772-4.

Corwin JT, Jones JE, Katayama A, Kelley MW, Warchol ME. 1991. Hair cell regeneration: the identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues. *Ciba Found Symp*. 1991;160:103-20; discussion 120-30.

Cotanche DA. 1987. Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear Res*. 1987;30(2-3):181-95.

Crofton KM, Knight T. 1991. Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat. *Neurotoxicol Teratol*. 1991 Nov-Dec;13(6):575-81.

Crofton KM, Janssen R, Prazma J, Pulver S, Barone S Jr. 1994. The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hear Res.* 1994 Nov;80(2):129-40.

Cruz RM, Lambert PR, Rubel EW. 1987. Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987 Oct;113(10):1058-62.

Cunningham LL. 2006. The adult mouse utricle as an in vitro preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain Res.* 2006;1091:277–81.

D

Dakoji S, Tomita S, Karimzadegan S, Nicoll RA, Brecht DS. 2003. Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology.* 2003 Nov;45(6):849-56.

Dalet A, Bonsacquet J, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chidavaenzi RL, Venteo S, Desmadryl G, Goldberg JM, Lysakowski A, Chabbert C. 2012. Glutamate transporters EAAT4 and EAAT5 are expressed in vestibular hair cells and calyx endings. *PLoS One.* 2012;7(9):e46261.

Dalton DS, Cruickshanks KJ, Klein BE, Klein R, Wiley TL, Nondahl DM. 2003. The impact of hearing loss on quality of life in older adults. *Gerontologist.* 2003 Oct;43(5):661-8.

Dau J, Wenthold RJ. 1989. Immunocytochemical localization of neurofilament subunits in the spiral ganglion of normal and neomycin-treated guinea pigs. *Hear Res.* 1989;42:253–64.

Dechesne C, Mbiene J-P, Sans A. 1986. Postnatal development of vestibular receptor surfaces in the rat. *Acta Otolaryngol.* 1986;101:11-18.

Dechesne CJ, Thomasset M, Brehier A, Sans A. 1988. Calbindin (CaBP 28 kDa) localization in the peripheral vestibular system of various vertebrates. *Hear Res.* 1988 Jun;33(3):273-8.

De Groot JC, Huizing EH, Veldman JE. 1991. Early ultrastructural effects of gentamicin cochleotoxicity. *Acta Otolaryngol.* 1991;111(2):273-80.

Delay J, Bertagna L, Lauras A. 1952. Hystero-organic deafness; effect of amphetamine shock. *Ann Med Psychol.* 1952 Jul;110(2):238-41.

Demêmes D, Eybalin M, Renard N. 1993. Cellular distribution of parvalbumin immunoreactivity in the peripheral vestibular system of three rodents. *Cell Tissue Res.* 1993 Dec;274(3):487-92.

Demêmes D, Seoane A, Venteo S, Desmadryl G. 2000. Efferent function of vestibular afferent endings? Similar localization of N-type calcium channels, synaptic vesicle and synaptic membrane-associated proteins. *Neuroscience.* 2000;98(2):377-384.

Desmadryl G, Dechesne CJ. 1992. Calretinin immunoreactivity in chinchilla and guinea pig vestibular end organs characterizes the calyx unit subpopulation. *Exp Brain Res.* 1992;89(1):105-8.

Desmadryl G, Gaboyard-Niay S, Brugeaud A, Travo C, Broussy A, Saleur A, Dyhrfeld-Johnsen J, Wersinger E, Chabbert C. 2012. Histamine H4 receptor antagonists as potent modulators of mammalian vestibular primary neuron excitability. *Br J Pharmacol.* 2012 Oct;167(4):905-16.

DeVito MJ, Beebe LE, Menache M, Birnbaum LS. 1996. Relationship between CYP1A enzyme activities and protein levels in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Toxicol Environ Health.* 1996 Mar;47(4):379-94.

Dickman JD, Lim I. 2004. Posture, head stability, and orientation recovery during vestibular regeneration in pigeons. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2004 Sep;5(3):323-36. Epub 2004 Aug 12.

Ding D, Jiang H, Salvi RJ. 2010. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following coadministration of gentamicin and ethacrynic acid. *Hear Res.* 2010;259:16–23.

Dix MR, Hallpike CS. 1952. The pathology, symptomatology and diagnosis of certain common disorders of the vestibular system. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1952 Mar 15;15:341-54.

Dowling JE. 1987. *The retina: an approachable part of the brain.* Cambridge, MA: Harvard University Press.

Dulon D, Safieddine S, Jones SM, Petit C. 2009. Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. *J Neurosci.* 2009 Aug 26;29(34):10474-87.

Dupont J, Guilhaume A, Aran JM. 1993. Neuronal degeneration of primary cochlear and vestibular innervations after local injection of sisomicin in the guinea pig. *Hear Res.* 1993 Aug;68(2):217-28.

E

El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* 2000 Nov 17;290(5495):1364-8.

Ernfors P, Duan ML, ElShamy WM, Canlon B. 1996. Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat Med.* 1996 Apr;2(4):463-7.

F

Faivre-Sarrailh C, Banerjee S, Li J, Hortsch M, Laval M, Bhat M. 2004. Drosophila contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *The Company of Biologists Development.* 2004 Oct;131(20):4931-4942.

Falk J, Bonnon C, Girault JA, Faivre-Sarrailh C. 2002. F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol Cell*. 2002 Oct;94(6):327-34.

Fechter LD, Liu Y, Herr DW, Crofton KM. 1998. Trichloroethylene ototoxicity: evidence for a cochlear origin. *Toxicol Sci*. 1998 Mar;42(1):28-35.

Fleming FF, Yao L, Ravikumar PC, Funk L, Shook BC. 2010. Nitrile-containing pharmaceuticals: efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *J Med Chem*. 2010 Nov 25;53(22):7902-7917.

Fliegner KH, Liem RK. 1991. Cellular and molecular biology of neuronal intermediate filaments. *Int Rev Cytol*. 1991;131:109-67.

Forgacs J. 1960. Ocular changes in experimental lathyrism due to iminodipropionitrile. *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol*. 1960 Apr-May;20:275-84.

Forge A. 1985. Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear Res*. 1985;19(2):171-82.

Forge A, Li L, Corwin JT, Nevill G. 1993. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science*. 1993 Mar 12;259(5101):1616-9.

Forge A, Li L. 2000. Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear Res*. 2000 Jan;139(1-2):97-115.

Forge A, Schacht J. 2000. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol*. 2000 Jan-Feb;5(1):3-22.

Fukata Y, Tzingounis AV, Trinidad JC, Fukata M, Burlingame AL, Nicoll RA, Brecht DS. 2005. Molecular constituents of neuronal AMPA receptors. *J Cell Biol*. 2005 May 9;169(3):399-404.

G

Gacek RR. 1982. Afferent and efferent innervation of the labyrinth. *Adv Otorhinolaryngol.* 1982;28:1-13.

Gates GA, Mills JH. 2005. Presbycusis. *Lancet.* 2005 Sep 24-30;366(9491):1111-20.

Genter MB, Llorens J, O'Callaghan JP, Peele DB, Morgan KT, Crofton KM. 1992. Olfactory toxicity of beta,beta'-iminodipropionitrile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Dec;263(3):1432-9.

Gentschev T, Sotelo C. 1973. Degenerative patterns in the ventral cochlear nucleus of the rat after primary deafferentation. An ultra-structural study. *Brain Res.* 1973 Nov 9;62(1):37-60.

Goldberg JM, Lysakowski A, Fernández C. 1990. Morphophysiological and ultrastructural studies in the mammalian cristae ampullares. *Hear Res.* 1990 Nov;49(1-3):89-102.

Goldin A, Noe HA. 1948. A neurological syndrome induced by administration of some chlorinated tertiary amines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1948 Nov;94(3):249-61.

Gollan L, Sabanay H, Poliak S, Berglund EO, Ranscht B, Peles E. 2002. Retention of a cell adhesion complex at the paranodal junction requires the cytoplasmic region of Caspr. *J Cell Biol.* 2002 Jun 24;157(7):1247-56.

Goode CT, Carey JP, Fuchs AF, Rubel EW. 1999. Recovery of the vestibulocolic reflex after aminoglycoside ototoxicity in domestic chickens. *J Neurophysiol.* 1999 Mar;81(3):1025-35.

Greger IH, Khatri L, Ziff EB. 2002. RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron.* 2002 May 30;34(5):759-72.

Griffin JW, Hoffman PN, Clark AW, Carroll PT, Price DL. 1978. Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment of beta,beta'-iminodipropionitrile administration. *Science.* 1978 Nov 10;202(4368):633-5.

Groves AK. 2010. The challenge of hair cell regeneration. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010 Apr;235(4):434-46.

Guthrie OW. 2008. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology*. 2008 Jul 30;249(2-3):91-6.

Gwag BJ, Canzoniero LM, Sensi SL, Demaro JA, Koh JY, Goldberg MP, Jacquin M, Choi DW. 1999. Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience*. 1999;90(4):1339-48.

H

Heath H, Rutter AC. 1966. Retinal angiopathy in the imino-dipropionitrile-treated alloxan-diabetic rat. *Br J Exp Pathol*. 1966 Apr;47(2):116-20.

Hennig AK, Cotanche DA. 1998. Regeneration of cochlear efferent nerve terminals after gentamycin damage. *J Neurosci*. 1998 May 1;18(9):3282-96.

Hilding D, Wersall J. 1962. Cholinesterase and its relation to the nerve endings in the inner ear. *Acta Otolaryngol*. 1962 Sep;55:205-17.

Hinojosa R, Lerner SA. 1987. Cochlear neural degeneration without hair cell loss in two patients with aminoglycoside ototoxicity. *J Infect Dis*. 1987 Sep;156(3):449-55.

Hirose K, Lesnick E, Westrum LE, Cunningham DE, Rubel EW. 2004. Electron microscopy of degenerative changes in the chick basilar papilla after gentamicin exposure. *J Comp Neurol*. 2004 Mar 1;470(2):164-80.

Hoet P, Lison D. 2008. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit Rev Toxicol*. 2008;38(2):127-70.

Holt JC, Chatlani S, Lysakowski A, Goldberg JM. 2007. Quantal and nonquantal transmission in calyx-bearing fibers of the turtle posterior crista. *J Neurophysiol*. 2007 Sep;98(3):1083-101.

Hopsu VK, Arstila AU. 1964. An aparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. *Exp Cell Res.* 1965 Feb;37:484-7.

Hordichok AJ, Steyger PS. 2007. Closure of supporting cell scar formations requires dynamic actin mechanisms. *Hear Res.* 2007 Oct;232(1-2):1–19.

Horresh I, Bar V, Kissil JL, Peles E. 2010. Organization of myelinated axons by Caspr and Caspr2 requires the cytoskeletal adapter protein 4.1B. *J Neurosci.* 2010 Feb 17;30(7):2480–2489.

Hunt MA, Miller SW, Nielson HC, Horn KM. 1987. Intratympanic injection of sodium arsanilate (atoxyl) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav Neurosci.* 1987 Jun;101(3):427-8.

Hunt CA, Schenker LJ, Kennedy MB. 1996. PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J Neurosci.* 1996 Feb 15;16(4):1380-8.

Hunter-Duvar IM, Hinojosa R. 1984. Vestibule: Sensory epithelia. In: Fiedmann I, Ballantyne J, eds. *Ultrastructural atlas of the inner ear.* London: Butterworths. 1984:211-244.

Huppert D, Strupp M, Theil D, Glaser M, Brandt T. 2006. Low recurrence rate of vestibular neuritis: a long-term follow-up. *Neurology.* 2006 Nov 28;67(10):1870-1.

Hurley K, Gaboyard S, Zhong M, Price S, Wooltorton J, Lysakowski A, Eatock R. 2006. M-like K⁺ currents in type I hair cells and calyx afferent endings of the developing rat utricle. *The Journal of Neuroscience.* 2006 Oct 4;26(40):10253-10269.

I

Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron.* 2007 Jun 21;54(6):859-71.

Ishiyama G, Finn M, Lopez I, Tang Y, Baloh RW, Ishiyama A. 2005. Unbiased quantification of Scarpa's ganglion neurons in aminoglycoside ototoxicity. *J Vestib Res.* 2005;15(4):197-202.

Ishiyama G, López IA, Ishiyama A. 2006. Aquaporins and Meniere's disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Oct;14(5):332-6.

Ishiyama G. 2009. Imbalance and vertigo: the aging human vestibular periphery. *Semin Neurol.* 2009 Nov;29(5):491-9.

Iurato S, Luciano L, Pannese E, Reale E. 1972. Efferent vestibular fibers in mammals: morphological and histochemical aspects. *Prog Brain Res.* 1972;37:429-43.

J

Jastrow H, von Mach MA, Vollrath L. 1997. The shape of synaptic ribbons in the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 1997 Feb;287(2):255-61.

Jensen DW. 1983. Survival of function in the deafferented vestibular nerve. *Brain Res.* 1983 Aug 22;273(1):175-8.

Jiang H, Sha SH, Forge A, Schacht J. 2006. Caspase-independent pathways of hair cell death induced by kanamycin in vivo. *Cell Death Differ.* 2006;13:20–30.

Jones TA, Nelson RC. 1992. Recovery of vestibular function following hair cell destruction by streptomycin. *Hear Res.* 1992 Oct;62(2):181-6.

Juhn SK, Rybak LP. 1981. Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol.* 1981 May-Jun;91(5-6):529-34.

Juhn SK. 1988. Barrier systems in the inner ear. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1988;458:79-83.

Julien JP, Mushynski WE. 1998. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;61:1-23.

K

Khan S, Chang R. 2013. Anatomy of the vestibular system: a review. *NeuroRehabilitation*. 2013;32(3):437-43.

Kharkovets T, Hardelin J-P, Safieddine S, Schweizar M, El-Amreoui A, Petit C, Jentsch T. 2000. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Neurobiology*. 2000 Apr 11;97:4333-8.

Koitchev K, Guilhaume A, Cazals Y, Aran JM. 1982. Spiral ganglion changes after massive aminoglycoside treatment in the guinea pig. Counts and ultrastructure. *Acta Otolaryngol*. 1982 Nov-Dec;94(5-6):431-8.

Kotecha B, Richardson GP. 1994. Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear Res*. 1994 Mar;73(2):173-84.

L

Ladrech S, Guitton M, Saido T, Lenoir M. 2004. Calpain activity in the amikacin-damaged rat cochlea. *J Comp Neurol*. 2004 Sep 13;477(2):149-60.

Lang H, Liu C. 1997. Apoptosis and hair cell degeneration in the vestibular sensory epithelia of the guinea pig following a gentamicin insult. *Hearing Research*. 1997 Sep;111(1-2):177-84.

Laval M, Bel C, Faivre-Sarrailh C. 2008. The lateral mobility of cell adhesion molecules is highly restricted at septate junctions in *Drosophila*. *BMC Cell Biol*. 2008 Jul 18;9:38.

Lee KS, Kimura RS. 1994. Ultrastructural changes of the vestibular sensory organs after streptomycin application on the lateral canal. *Scanning Microsc*. 1994 Mar;8(1):107-21; discussion 121-4.

Lee MK, Cleveland DW. 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:187-217.

Lenoir M, Puel JL. 1987. Dose-dependent changes in the rat cochlea following aminoglycoside intoxication. II. Histological study. *Hear Res.* 1987;26(2):199-209.

Lenoir M, Daudet N, Humbert G, Renard N, Gallego M, Pujol R, Eybalin M, Vago P. 1999. Morphological and molecular changes in the inner hair cell region of the rat cochlea after amikacin treatment. *J Neurocytol.* 1999 Oct-Nov;28(10-11):925-37.

Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM. 1999. Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J Neurosci.* 1999 Jan 1;19(1):119-32.

Leonova EV, Raphael Y. 1997. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxically damaged organ of Corti. *Hear Res.* 1997 Nov;113(1-2):14-28.

Leung CL, Flores RL, Liem RK. 1998. The complexity of intermediate filaments in the nervous system. *Subcell Biochem.* 1998;31:497-526.

Li L, Nevill G, Forge A. 1995. Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *The Journal of Comparative Neurology.* 1995 May 8;355(3):405-17.

Li W, Correia MJ. 1998. Recovery of semicircular canal primary afferent activity in the pigeon after streptomycin ototoxicity. *J Neurophysiol.* 1998 Dec;80(6):3297-311.

Lieberman MC, Dodds LW, Pierce S. 1990. Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol.* 1990 Nov 15;301(3):443-60.

Lindeman HH. 1969a. Regional differences in structure of the vestibular sensory regions. *J Laryngol Otol.* 1969 Jan;83(1):1-17.

Lindeman HH. 1969b. Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol.* 1969 Feb-Mar;67(2):177-89.

Llorens J, Crofton KM, O'Callaghan JP. 1993a. Administration of 3,3'-iminodipropionitrile to the rat results in region-dependent damage to the central nervous system at levels above the brain stem. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Jun;265(3):1492-8.

Llorens J, Demêmes D, Sans A. 1993b. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993 Dec;123(2):199-210.

Llorens J, Demêmes D. 1994. Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia. *Hear Res.* 1994 Jun 1;76(1-2):78-86.

Llorens J, Rodríguez-Farré E. 1997. Comparison of behavioural, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicology and Teratology.* 1997 Mar-Apr;19(2):117-27.

Llorens J, Aguiló A, Rodríguez-Farré E. 1998. Behavioral disturbances and vestibular pathology following crotonitrile exposure in rats. *J Peripher Nerv Syst.* 1998;3(3):189-96.

Lysakowski A. 1996. Synaptic organization of the crista ampullaris in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Jun 19;781:164-82.

Lysakowski A, Goldberg JM. 1997. A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *J Comp Neurol.* 1997 Dec 22;389(3):419-43.

Lysakowski A, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chatlani S, Price SD, Eatock RA. 2011. Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *J Neurosci.* 2011 Jul 6;31(27):10101-14.

M

Mangiardi DA, McLaughlin-Williamson K, May KE, Messana EP, Mountain DC, Cotanche DA. 2004. Progression of hair cell ejection and molecular markers of apoptosis in the avian cochlea following gentamicin treatment. *J Comp Neurol.* 2004 Jul 12;475(1):1-18.

Masetto S, Correia MJ. 1997a. Ionic currents in regenerating avian vestibular hair cells. *Int J Dev Neurosci.* 1997 Jul;15(4-5):387-99.

Masetto S, Correia MJ. 1997b. Electrophysiological properties of vestibular sensory and supporting cells in the labyrinth slice before and during regeneration. *J Neurophysiol.* 1997 Oct;78(4):1913-27.

Matsubara A, Takumi Y, Nakagawa T, Usami S, Shinkawa H, Ottersen OP. 1999. Immunoelectron microscopy of AMPA receptor subunits reveals three types of putative glutamatergic synapse in the rat vestibular end organs. *Brain Res.* 1999 Feb 20;819(1-2):58-64.

Matsui JI, Gale JE, Warchol ME. 2004. Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J Neurobiol.* 2004;61(2):250–66.

Mbiene J-P, Sans A. 1986. Differentiation and maturation of the sensory hair bundles in the fetal and postnatal vestibular receptor of the mouse: a scanning electron microscopy study. *J. Comp Neurol.* 1986 Dec;254(2):271-8.

McCall AA, Ishiyama GP, Lopez IA, Bhuta S, Vetter S, Ishiyama A. 2009. Histopathological and ultrastructural analysis of vestibular endorgans in Meniere's disease reveals basement membrane pathology. *BMC Ear Nose Throat Disord.* 2009 Jun 3;9:4.

McCall AA, Yates BJ. 2011. Compensation following bilateral vestibular damage. *Front Neurol.* 2011 Dec 27;2:88.

McFadden SL, Ding D, Jiang H, Woo JM, Salvi RJ. 2002. Chinchilla models of selective cochlear hair cell loss. *Hear Res.* 2002 Dec;174(1-2):230-8.

Menegoz M, Gaspar P, Le Bert M, Galvez T, Burgaya F, Palfrey C, Ezan P, Arnos F, Girault JA. 1997. Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron.* 1997 Aug;19(2):319-31.

Merchant SN, Rauch SD, Nadol JB Jr. 1995. Ménière's disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1995;252(2):63-75.

Migues PV, Cammarota M, Kavanagh J, Atkinson R, Powis DA, Rostas JA. 2007. Maturation changes in the subunit composition of AMPA receptors and the functional consequences of their activation in chicken forebrain. *Dev Neurosci.* 2007;29(3):232-40.

Minor LB, Schessel DA, Carey JP. 2004. Ménière's disease. *Curr Opin Neurol.* 2004 Feb;17(1):9-16.

Morton DB, Griffiths PH. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec.* 1985 Apr 20;116(16):431-6.

N

Nadol JB Jr, Thornton AR. 1987. Ultrastructural findings in a case of Ménière's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1987 Jul-Aug;96(4):449-54.

Nakagawa T, Yamane H, Shibata S, Takayama M, Sunami K, Nakai Y. 1997. Two modes of auditory hair cell loss following acoustic overstimulation in the avian inner ear. *ORL.* 1997 Nov-Dec;59(6):303-10.

Nicotera P, Leist M, Manzo L. 1999. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 1999. Feb;20(2):46-51.

Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T. 2006. Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol.* 2006 Feb-Mar;209(2-3):153-65.

Nuttall AL, LaRouere MJ, Lawrence M. 1982. Acute perilymphatic perfusion of the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 1982 Feb;6(2):207-21.

O

Ogawa Y, Schafer DP, Horresh I, Bar V, Hales K, Yang Y, Susuki K, Peles E, Stankewich MC, Rasband MN. 2006. Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton. *J Neurosci.* 2006 May 10;26(19):5230-9.

Oghalai JS & Brownell WE. 2012. Chapter 44. Anatomy & Physiology of the Ear. In A.K. Lalwani (Ed), *Current Diagnosis & Treatment in Otolaryngology—Head & Neck Surgery*, 3e.

Ossenkopp KP, Prkacin A, Hargreaves EL. 1990. Sodium arsenite-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990 Aug;36(4):875-81.

P

Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science.* 2004 Sep 24;305(5692):1972-5.

Peles E, Nativ M, Lustig M, Grumet M, Schilling J, Martinez R, Plowman G, Schlessinger J. 1997. Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interaction. *The EMBO Journal.* 1997 Mar 3;16(5):978-88.

Porter RH, Roberts PJ, Jane DE, Watkins JC. 1992. (S)-homoquisqualate: a potent agonist at the glutamate metabotropic receptor. *Br J Pharmacol.* 1992 Jul;106(3):509-10.

R

Ricci AJ, Cochran SL, Rennie KJ, Correia MJ. 1997. Vestibular type I and type II hair cells. 2: Morphometric comparisons of dissociated pigeon hair cells. *J Vestib Res.* 1997 Sep-Oct;7(5):407-20.

Roberson DW, Alosi JA, Cotanche DA. 2004. Direct transdifferentiation gives rise to the earliest new hair cells in regenerating avian auditory epithelium. *J Neurosci Res.* 2004 Nov 15;78(4):461-71.

Rúa F, Buffard M, Sedó-Cabezón L, Hernández-Mir G, de la Torre A, Saldaña-Ruiz S, Chabbert C, Bayona JM, Messeguer A, Llorens J. 2013. Vestibulotoxic properties of potential metabolites of allylnitrile. *Toxicol. Sci.* 2013;135:182–192.

Ruan Q, Ao H, He J, Chen Z, Yu Z, Zhang R, Wang J, Yin S. 2014. Topographic and quantitative evaluation of gentamicin-induced damage to peripheral innervation of mouse cochleae. *Neurotoxicology.* 2014 Jan;40:86-96.

Rubel EW, Furrer SA, Stone JS. 2013. A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear Res.* 2013 Mar;297:42–51.

Rush AM, Craner MJ, Kageyama T, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Ranscht B. 2005. Contactin regulates the current density and axonal expression of tetrodotoxin-resistant but not tetrodotoxin-sensitive sodium channels in DRG neurons. *Eur J Neurosci.* 2005 Jul;22(1):39-49.

Ryals BM, Westbrook EW. 1994. TEM analysis of neural terminals on autoradiographically identified regenerated hair cells. *Hear Res.* 1994 Jan;72(1-2):81-8.

Rybak LP, Whitworth CA. 2005. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today.* 2005 Oct 1;10(19):1313-21.

S

Saldaña-Ruíz S, Hernández-Mir G, Sedó-Cabezón L, Cutillas B, Llorens J. 2012. Vestibular toxicity of cis-2-pentenenitrile in the rat. *Toxicol Lett.* 2012 Jun 20;211(3):281-8.

Saldaña-Ruíz S, Boadas-Vaello P, Sedó-Cabezón L, Llorens J. 2013. Reduced systemic toxicity and preserved vestibular toxicity following co-treatment with nitriles and CYP2E1 inhibitors: a mouse model for hair cell loss. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2013 Oct;14(5):661-71.

Salzer JL. 2003. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron.* 2003 Oct 9;40(2):297-318.

Sans A, Chat M. 1982. Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography. *J Comp Neurol.* 1982 Mar 20;206(1):1-8.

Santos SD, Iuliano O, Ribeiro L, Veran J, Ferreira JS, Rio P, Mulle C, Duarte CB, Carvalho AL. 2011. Contactin-associated protein 1 (Caspr1) regulates the traffic and synaptic content of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors. *J Biol Chem.* 2012 Feb 24;287(9):6868–77.

Schacht J, Talaska AE, Rybak LP. 2012. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec (Hoboken).* 2012 Nov;295(11):1837-1850.

Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC. 2000. RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron.* 2000 Dec;28(3):857-72.

Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA. 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13902-7.

Schwartz IR, Ryan AF. 1986. Amino acid labeling patterns in the efferent innervation of the cochlea: an electron microscopic autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1986 Apr 22;246(4):500-12.

Sedó-Cabezón L, Boadas-Vaello P, Soler-Martín C, Llorens J. 2014. Vestibular damage in chronic ototoxicity: A mini-review. *Neurotoxicology.* 2014 Jul;43:21-7.

Sekiya T, Kojima K, Matsumoto M, Holley MC, Ito J. 2007. Rebuilding lost hearing using cell transplantation. *Neurosurgery.* 2007 Mar;60(3):417-33; discussion 433.

Selye H. 1957. Lathyrism. *Rev Can Biol.* 1957 Apr;16(1):1-82.

Seoane A, Espejo M, Pallàs M, Rodríguez-Farré E, Ambrosio S, Llorens J. 1999. Degeneration and gliosis in rat retina and central nervous system following 3,3'-iminodipropionitrile exposure. *Brain Res.* 1999 Jul 3;833(2):258-71.

Seoane A, Demêmes D, Llorens J. 2001a. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *J Comp Neurol.* 2001 Oct 29;439(4):385-99.

Seoane A, Demêmes D, Llorens J. 2001b. Pathology of the rat vestibular sensory epithelia during subchronic 3,3'-iminodipropionitrile exposure: hair cells may not be the primary target of toxicity. *Acta Neuropathol.* 2001 Oct;102(4):339-48.

Seoane A, Demêmes D, Llorens J. 2003. Distal effects in a model of proximal axonopathy: 3,3'-iminodipropionitrile causes specific loss of neurofilaments in rat vestibular afferent endings. *Acta Neuropathol.* 2003 Nov;106(5):458-70.

Seoane A, Apps R, Balbuena E, Herrero L, Llorens J. 2005. Differential effects of trans-crotonitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *Eur J Neurosci.* 2005 Aug;22(4):880-94.

Seoane A, Llorens J. 2005. Extruding auditory hair cells in rats exposed to subchronic 3,3'-iminodipropionitrile. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005 May;19(3):571-4.

Sera K, Harada Y, Tagashira N, Suzuki M, Hirakawa K, Ohya T. 1987. Morphological changes in the vestibular epithelia and ganglion induced by ototoxic drug. *Scanning Microsc.* 1987 Sep;1(3):1191-7.

Shen L, Liang F, Walensky LD, Haganir RL. 2000. Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4.1N-linked actin cytoskeletal association. *J Neurosci.* 2000 Nov 1;20(21):7932-40.

Sheng M, Sala C. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1-29.

Shin JB, Krey JF, Hassan A, Metlagel Z, Tauscher AN, Pagana JM, Sherman NE, Jeffery ED, Spinelli KJ, Zhao H, Wilmarth PA, Choi D, David LL, Auer M, Barr-Gillespie PG. 2013. Molecular architecture of the chick vestibular hair bundle. *Nat Neurosci.* 2013;16:365-74.

Shoham S, Chen YC, Devietti TL. 1989. Teitebaum Deafferentation of the vestibular organ: Effects on atropine-resistant EEG in rats. *Psychobiology.* 1989;17:307-314.

Silver EH, Kuttub SH, Hasan T, Hassan M. 1982. Structural considerations in the metabolism of nitriles to cyanide in vivo. *Drug Metab Dispos.* 1982 Sep-Oct;10(5):495-8.

Smith CA, Sjostrand FS. 1961. Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J Ultrastruct Res.* 1961 Dec;5:523-56.

Smith, C. A. 1968. Electron microscopy of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1968 Aug;77(4):629-43.

Soler-Martín C, Díez-Padrisa N, Boadas-Vaello P, Llorens J. 2007. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol Sci.* 2007 Mar;96(1):123-32.

Soler-Martín C, Vilardosa U, Saldaña-Ruiz S, Garcia N, Llorens J. 2012. Loss of neurofilaments in the neuromuscular junction in a rat model of proximal axonopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012 Feb;38(1):61-71.

Soler-Martín C, Boadas-Vaello P, Verdú E, Garcia N, Llorens J. 2014. Chronic proximal axonopathy in rats is associated with long-standing neurofilament depletion in neuromuscular junctions and behavioral deficits. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014 Jun;73(6):568-79.

Sone M, Schachern PA, Paparella MM. 1998. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hearing Res.* 1998 Jan;115 (1-2):217-23.

Sousa A, Andrade L, Salles F, Pillai A, Buttermore E, Bhat M, Kachar B. 2009. The septate junction protein Caspr is required for structural and retention of KCNQ4 at calyceal synapses of vestibular hair cells. *The Journal of Neuroscience.* 2009 Mar 11;29(10):3103-8.

Spiegel I, Salomon D, Erne B, Schaeren-Wiemers N, Peles E. 2002. Caspr3 and Caspr4, two novel members of the Caspr family are expressed in the nervous system and interact with PDZ domains. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2002 Jun;20(2):283-97.

Spitzmaul G, Tolosa L, Winkelmann BH, Heidenreich M, Frens MA, Chabbert C, de Zeeuw CI, Jentsch TJ. 2013. Vestibular role of KCNQ4 and KCNQ5 K⁺ channels revealed by mouse models. *J Biol Chem.* 2013 Mar 29;288(13):9334-44.

Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JI. 1998. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Cell Biology.* 1998;10:702-709.

Stathakis DG, Hoover KB, You Z, Bryant PJ. 1997. Human postsynaptic density-95 (PSD95): location of the gene (DLG4) and possible function in nonneural as well as in neural tissues. *Genomics.* 1997 Aug 15;44(1):71-82.

Sterling P. 1998. "Knocking out" a neural circuit. *Neuron.* 1998 Oct;21(4):643-4.

Steyger PS, Burton M, Hawkins JR, Schuff NR, Baird RA. 1997. Calbindin and parvalbumin are early markers of non-mitotically regenerating hair cells in the bullfrog vestibular otolith òrgans. *Int. J. Devl Neuroscience*. 1997;15(4):417-32.

Stone JS, Oesterle EC, Rubel EW. 1998. Recent insights into regeneration of auditory and vestibular hair cells. *Curr Opin Neurol*. 1998 Feb;11(1):17-24.

Stone JS, Cotanche DA. 2007. Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *Int J Dev Biol*. 2007;51:633-47.

Swartz DJ, Santi PA. 1999. Immunolocalization of tenascin in the chinchilla inner ear. *Hear Res*. 1999 Apr;130(1-2):108-14.

T

Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, Hayashi K, Nakayama M, Hara A. 2011. Ototoxicity: mechanisms of cochlear impairment and its prevention. *Curr Med Chem*. 2011;18(31):4866-71.

Takumi Y, Matsubara A, Danbolt NC, Laake JH, Storm-Mathisen J, Usami S, Shinkawa H, Ottersen OP. 1997. Discrete cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and the glutamate transporter GLAST in the rat vestibular end organ. *Neuroscience*. 1997 Aug;79(4):1137-44.

Takumida M, Wersäll J, Bagger-Sjöbäck D. 1989. Initial changes in the sensory hair-cell membrane following aminoglycoside administration in a guinea pig model. *Arch Otorhinolaryngol*. 1989;246(1):26-31.

Tanii H, Hashimoto K. 1982. Structure-toxicity relationship of acrylates and methacrylates. *Toxicol Lett*. 1982 Apr;11(1-2):125-9.

Tanii H, Hashimoto K. 1984. Studies on the mechanism of acute toxicity of nitriles in mice. *Arch Toxicol*. 1984 Mar;55(1):47-54.

Thuillier J, Burger A. 1954. Contribution to the study of the motor syndrome produced by aminodipropionitrile in mica. *Experientia*. 1954 May 15;10(5):223-4.

Tilson HA, Mitchell CL. 1984. Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemicals on the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984;24:425-50.

tom Dieck S, Altrock WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtová A, Bracko O, Gundelfinger ED, Brandstätter JH. 2005. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol*. 2005 Feb 28;168(5):825-36.

Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA, Brecht DS. 2003. Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol*. 2003 May 26;161(4):805-16.

Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS. 2005. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature*. 2005 Jun 23;435(7045):1052-8.

Tucci DL, Rubel EW. 1990. Physiologic status of regenerated hair cells in the avian inner ear following aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990; 103:443-50.

V

Vago P, Humbert G, Lenoir M. 1998. Amikacin intoxication induces apoptosis and cell proliferation in rat organ of Corti. *Neuroreport*. 1998 Feb 16;9(3):431-6.

W

Warchol ME, Lambert PR, Goldstein BJ, Forge A, Corwin JT. 1993. Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science*. 1993 Mar 12;259(5101):1619-22.

Warchol ME, Speck JD. 2007. Expression of GATA3 and tenascin in the avian vestibular maculae: normative patterns and changes during sensory regeneration. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 1;500(4):646-57.

Warchol ME. 2010. Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Oct;18(5):454-8.

Weisleder P, Rubel EW. 1992. Hair cell regeneration in the avian vestibular epithelium. *Exp Neurol*. 1992 Jan;115(1):2-6.

Weisleder P, Rubel EW. 1993. Hair cell regeneration after streptomycin toxicity in the avian vestibular epithelium. *J Comp Neurol*. 1993 May 1;331(1):97-110.

Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):1982-9.

Wersäll J, Hawkins JE Jr. 1962. The vestibular sensory epithelia in the cat labyrinth and their reactions in chronic streptomycin intoxication. *Acta Otolaryngol*. 1962 Jan;54:1-23.

Wersäll J, Björkroth B, Flock A, Lundquist PG. 1973. Experiments on ototoxic effects of antibiotics. *Adv Otorhinolaryngol*. 1973;20:14-41.

Whitworth CA, Hudson TE, Rybak LP. 1999. The effect of combined administration of cadmium and furosemide on auditory function in the rat. *Hear Res*. 1999 Mar;129(1-2):61-70.

Wilkins HR, Presson JC, Popper AN. 1999. Proliferation of vertebrate inner ear supporting cells. *J Neurobiol*. 1999 Jun 15;39(4):527-35.

Wooltorton JR, Gaboyard S, Hurley KM, Price SD, Garcia JL, Zhong M, Lysakowski A, Eatock RA. 2007. Developmental changes in two voltage-dependent sodium currents in utricular hair cells. *J Neurophysiol*. 2007 Feb;97(2):1684-704.

Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. 2001. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear Res.* 2001;158(1-2):165-78.

Y

Yan Y, Jensen K, Brown A. 2007. The polypeptide composition of moving and stationary neurofilaments in cultured sympathetic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2007 Apr;64(4):299-309.

Ylikoski J, Wersäll J, Björkroth B. 1974. Degeneration of neural elements in the cochlea of the guinea-pig after damage to the organ of corti by ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1974;326:23-41.

Yorgason JG, Fayad JN, Kalinec F. 2006. Understanding drug ototoxicity: molecular insights for prevention and clinical management. *Expert Opin Drug Saf.* 2006 May;5(3):383-99.

Yorgason JG, Luxford W, Kalinec F. 2011. In vitro and in vivo models of drug ototoxicity: studying the mechanisms of a clinical problem. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011 Dec;7(12):1521-34.

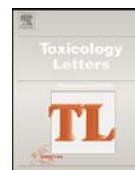
Yuan A, Sasaki T, Rao MV, Kumar A, Kanumuri V, Dunlop DS, Liem RK, Nixon RA. 2009. Neurofilaments form a highly stable stationary cytoskeleton after reaching a critical level in axons. *J Neurosci.* 2009 Sep 9;29(36):11316-29.

Z

Zanazzi G, Matthews G. 2009. The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals. *Mol Neurobiol.* 2009 Apr;39(2):130-48.

ANNEX

CONTRIBUCIONS ADDICIONALS



Vestibular toxicity of *cis*-2-pentenenitrile in the rat

Sandra Saldaña-Ruíz^{a,c}, Gerard Hernández-Mir^a, Lara Sedó-Cabezón^{a,c}, Blanca Cutillas^b, Jordi Llorens^{a,c,*}

^a Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat (Catalunya), Spain

^b Departament d'Infermeria Fonamental i Medicoquirúrgica, Universitat de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat (Catalunya), Spain

^c Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 Hospitalet de Llobregat (Catalunya), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2012

Received in revised form 10 April 2012

Accepted 12 April 2012

Available online 21 April 2012

Keywords:

Ototoxicity

Vestibular toxicity

Nitriles

Hair cells

Neuronal degeneration stain

ABSTRACT

cis-2-Pentenenitrile, an intermediate in the synthesis of nylon and other products, causes permanent behavioral deficits in rodents. Other low molecular weight nitriles cause degeneration either of the vestibular sensory hair cells or of selected neuronal populations in the brain. Adult male Long-Evans rats were exposed to *cis*-2-pentenenitrile (0, 1.25, 1.50, 1.75, or 2.0 mmol/kg, oral, in corn oil) and assessed for changes in open field activity and rating scores in a test battery for vestibular dysfunction. Surface preparations of the vestibular sensory epithelia were observed for hair cell loss using scanning electron microscopy. A separate experiment examined the impact of pre-treatment with the universal CYP inhibitor, 1-aminobenzotriazole, on the effect of *cis*-2-pentenenitrile on vestibular rating scores. The occurrence of degenerating neurons in the central nervous system was assessed by Fluoro-Jade C staining. *cis*-2-Pentenenitrile had a dose-dependent effect on body weight. Rats receiving 1.50 mmol/kg or more of *cis*-2-pentenenitrile displayed reduced rearing activity in the open field and increased rating scores on the vestibular dysfunction test battery. Hair cell loss was observed in the vestibular sensory epithelia and correlated well with the behavioral deficits. Pre-treatment with 1-aminobenzotriazole blocked the behavioral effect. Fluoro-Jade C staining did not reveal significant neuronal degeneration in the central nervous system apart from neurite labeling in the olfactory glomeruli. We conclude that *cis*-2-pentenenitrile causes vestibular toxicity in a similar way to allylnitrile, *cis*-crotonitrile and 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), and also shares other targets such as the olfactory system with these other nitriles. The present data also suggest that CYP-mediated bioactivation is involved in *cis*-2-pentenenitrile toxicity.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nitriles are compounds containing cyano (R-CN) groups; their toxic effects include acute lethality, osteolathyrism and neurotoxicity, including sensory toxicity (DeVito, 1996; Llorens et al., 2011; Saldaña-Ruíz et al., 2012). Among sensory systems, the inner ear is a major target for several nitriles: degeneration of the vestibular and/or auditory sensory hair cells has been reported in rodents exposed to 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Crofton et al., 1994; Seoane et al., 2001a,b; Soler-Martín et al., 2007), allylnitrile (Balbuena and Llorens, 2001; Gagnaire et al., 2001), racemic crotonitrile (Llorens et al., 1998; Gagnaire et al., 2001), and *cis*-crotonitrile (Balbuena and Llorens, 2003). IDPN has also been shown to cause

vestibular toxicity in frogs (Soler-Martín et al., 2007). One nitrile causing vestibular toxicity in mice, *trans*-crotonitrile (Saldaña-Ruíz et al., 2012) has a different profile of neurotoxic effects in the rat, causing selective neuronal degeneration in discrete regions of the brain including the inferior olive and the piriform cortex (Seoane et al., 2005; Boadas-Vaello et al., 2005). Hexadienenitrile shows a similar effect in rat brain (Boadas-Vaello et al., 2005).

Another ototoxic nitrile is *cis*-2-pentenenitrile (CAS no. 25899-50-7). This nitrile has been shown to cause loss of the cochlear hair cells in rodents (Gagnaire et al., 2001) and behavioral disturbances indicative of vestibular toxicity (Tanii et al., 1989; Genter and Crofton, 2000; Lewis et al., 2006; Saldaña-Ruíz et al., 2012), but this vestibular toxicity has not yet been studied in detail. A deeper knowledge of the toxicological properties of *cis*-2-pentenenitrile is desirable, because it is a chemical intermediate associated with the production of nylon monomer and it is also used in a number of chemical synthesis pathways for pesticides, solvents, and other marketed chemicals (Lewis et al., 2006; DeVito, 2007). Therefore, we characterized the acute vestibular toxicity of *cis*-2-pentenenitrile in rats, assessing both its behavioral and

* Corresponding author at: Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain.

Tel.: +34 93 402 4277; fax: +34 93 402 4268.

E-mail address: jllorens@ub.edu (J. Llorens).

pathological effects. Because similar nitriles have been shown to cause CNS toxicity, we also evaluated the CNS for presence of degenerating neurons after *cis*-2-pentenenitrile exposure. Simultaneously, we evaluated whether cytochrome-P450-mediated metabolism is involved in *cis*-2-pentenenitrile vestibular toxicity, as it is in allylnitrile toxicity (Boadas-Vaello et al., 2009).

2. Methods

2.1. Chemicals and reagents

cis-2-Pentenenitrile (98%) and 1-aminobenzotriazole (>98%) were purchased from Sigma–Aldrich Química (Madrid, Spain). Hexadienenitrile (>98%) was from Frinton Laboratories (Vineland, NJ, USA). Fluoro-Jade C was from Histo-Chem Inc. (Jefferson, AR, USA).

2.2. Animals

Animal care and use were in accordance with Law 5/1995 and Act 214/1997 of the Government of Catalonia (the Generalitat), and were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the University of Barcelona. Eight- to 9-week-old male Long-Evans rats were obtained from Janvier (Le-Genest-Saint-Isle, France). They were housed two per cage in standard Macrolon cages (280 mm × 520 mm × 145 mm) with wood shavings as bedding at 22 ± 2 °C. At least seven days were provided for acclimation before experimentation. The rats were maintained on a 12:12 L:D cycle (0700:1900 h) and given standard diet pellets (TEKLAD 2014, Harlan Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) ad libitum. For fluoro-jade C staining, the rats were anesthetized with 400 mg/kg chloral hydrate and transcardially perfused with 50 ml of heparinized saline followed by 350 ml of 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. For scanning electron microscopy, rats were anesthetized and killed by decapitation.

2.3. Dosing and experimental design

cis-2-Pentenenitrile was administered orally in 1 ml/kg of corn oil. Pilot studies for dose selection were designed based on available data (Genter and Crofton, 2000; Gagnaire et al., 2001; Saldaña-Ruiz et al., 2012). First, two rats were orally administered 1 mmol/kg/day for three consecutive days. Second, two animals were administered 1.5 mmol/kg. Third, one animal was administered 2.0 mmol/kg. In a first experiment, rats were administered with 0 (control vehicle, $n = 7$), 1.25 ($n = 7$), 1.50 ($n = 7$), 1.75 ($n = 7$), or 2.0 ($n = 4$) mmol/kg of *cis*-2-pentenenitrile, and assessed for behavioral evidences of vestibular dysfunction at days 0 (pre-test), 3, 7, and 21 after dosing. The experiment was run in two parts, with three animals per dose (except for the 2.0 mmol/kg dose) in the first part, and four animals per dose in the second part. Selected animals from each group ($n = 2, 3, 3, 4$, and 2, respectively) were used for vestibular histology at 36–42 days after dosing.

In a second experiment, three groups of rats were given control vehicle, 2.0 mmol/kg of *cis*-2-pentenenitrile and saline, or *cis*-2-pentenenitrile and 1-aminobenzotriazole ($n = 7$ /group), and were assessed for behavioral evidences of vestibular dysfunction at days 0 (pre-test), 3 and 7 after dosing. 1-Aminobenzotriazole is an universal P-450 inhibitor (Mico et al., 1988), and was administered in 2 ml/kg of saline, i.p., 1 h before and 24 h after the nitrile administration (Boadas-Vaello et al., 2009). Animals from this experiment were also used for labeling of degenerating neurons with fluoro-jade (Schmued and Hopkins, 2000a,b; Schmued et al., 2005) at day 7. As positive control for the degeneration stain, two animals dosed with hexadienenitrile (3.25 mmol/kg/day in 2 ml/kg of corn

oil, i.p., for three consecutive days, Boadas-Vaello et al., 2005) were processed in parallel.

2.4. Behavioral analysis

Vestibular dysfunction was evaluated by observation of spontaneous and reflex motor behaviors as described previously (Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Boadas-Vaello et al., 2005). Briefly, rats were placed for 1 min on transparent cage (50 cm × 50 cm), and the experimenter rated the animals from 0 to 4 for circling, retropulsion, and abnormal head movements. Circling was defined as stereotyped circling movement, retropulsion as backward displacement, and head bobbing as intermittent extreme backward extension of the neck. The rats were then rated 0–4 for the tail-hang reflex, contact inhibition of the righting reflex, and air-righting reflex tests. When lifted by the tail, normal rats exhibit a “landing” response consisting of forelimb extension. Rats with impaired vestibular function bent ventrally, sometimes “crawling” up toward their tails, thus tending to occipital landing. For the contact inhibition of the righting reflex, rats were placed supine on a horizontal surface, and a metal bar grid was lightly placed in contact with the soles of the animals’ feet. Healthy rats quickly right themselves, whereas vestibular-deficient rats lie on their back, with their feet up, and “walk” with respect to the ventral surface. For the air-righting reflex, the animals were held supine and dropped from a height of 40 cm onto a foam cushion. Normal rats are successful in righting themselves in the air, whereas vestibular deficient rats are not. The results of all tests were summed to obtain a score of 0–24.

2.5. Histology

To identify degenerating neurons in the central nervous system, brain and spinal cord tissues were removed from the perfusion-fixed animals and immersed in the same fixative at 4 °C for up to one week. The whole brain and one slice sample from each the cervical and the lumbar regions of the spinal cord were cut in transverse sections (50 μm) using a Leica VT1000M vibrating blade microtome. Every third section was dried onto a microscopy slide for subsequent staining with Fluoro-Jade C (Schmued et al., 2005). Degenerating neurons were identified by comparison of Fluoro-Jade C stained sections with the appearance of the corresponding structures in the normal brain, according to the atlases by Paxinos et al., 1999a,b.

To assess vestibular pathology, we examined surface preparations of the vestibular sensory epithelia by scanning electron microscopy (SEM), as previously done with IDPN (Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Seoane et al., 2001a,b), allylnitrile (Balbuena and Llorens, 2001), and *cis*- and *trans*-crotonitrile (Balbuena and Llorens, 2003). The sensory epithelia were quickly dissected out from the temporal bones in ice-cold 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, using a stereomicroscope in a fume hood. With few exceptions, the complete set of entire vestibular receptors was obtained from one ear. The samples were fixed for 1.5 h in the same solution, post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer and subsequently stored in 70% ethanol at 4 °C. For observation, the epithelia were dehydrated with increasing concentrations of ethanol up to 100%, dried in a critical-point dryer using liquid CO₂, coated with 5 nm of gold, and stored in a vacuum chamber for 1–3 days. The epithelia were then observed in a Quanta-200 SEM (FEI Company, Hillsboro, OR, USA).

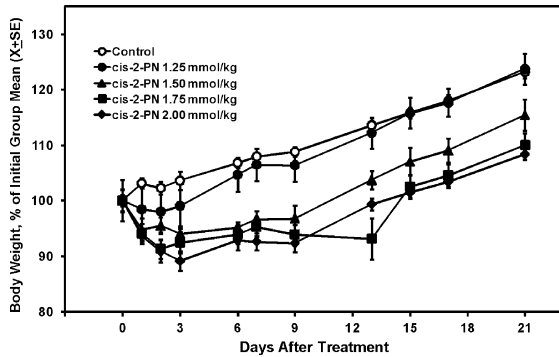


Fig. 1. Effects of *cis*-2-pentenenitrile on body weight. Data are mean \pm SE body weight values expressed as percentages of initial group mean values.

2.6. Statistics

Body weight and behavioral data were analyzed using ANOVA or repeated measures MANOVA – Wilks' criterion – with "day" as the within subject factor. Orthogonal contrasts, followed by Duncan's test when applicable, were used for post hoc analysis. The α level was set at 0.05. The PASW 18.0 for Windows program package was used.

3. Results

3.1. General observations in animals exposed to *cis*-2-pentenenitrile

In the pilot studies for dose selection, the animals administered 1.0 mmol/kg/day of *cis*-2-pentenenitrile for three days showed a 6% decrease in body weight but neither behavioral evidences of vestibular dysfunction nor other signs of overt toxicity. The two animals dosed with 1.5 mmol/kg showed behavioral evidences of vestibular dysfunction at 24 h after the first dose, and they received no additional doses. The animal dosed with 2.0 mmol/kg showed behavioral evidences of vestibular dysfunction at 24 h after the first dose, received no additional doses, and was killed at 48 h as it reached the criteria of ethical limits of suffering.

After treatment with *cis*-2-pentenenitrile in the dose-response study, one animal in the 1.50 mmol/kg *cis*-2-pentenenitrile group died on day 6, but no mortality was recorded in the other experimental groups. Before administration, mean group body weights were not significantly different, $F(4, 26) = 2.1, p = 0.104$, but control rats had a mean value of 308 g compared to 283 g in the group of rats receiving 1.25 mmol/kg of *cis*-2-pentenenitrile. To reduce the chances for false positive results, we analyzed body weight data as percent weight respect the mean group weight before administration (Fig. 1). A dose-dependent effect on body weight was recorded. Maximal effects were recorded three days after dosing, when mean body weights were 104%, 99%, 94%, 92%, and 89% of initial means for the control, 1.25, 1.50, 1.75, and 2.0 mmol/kg of *cis*-2-pentenenitrile groups respectively. MANOVA analysis revealed significant effects of day, $F(10, 17) = 109, p = 0.000$, day by treatment, $F(40, 66) = 3.55, p = 0.000$, and treatment, $F(4, 26) = 7.27, p = 0.000$. Significant group differences were detected on all days beginning on day 2 after exposure (all $F_s(4, 26) > 3.5, p_s < 0.022$). Compared to control values, body weights were significantly reduced for the two high dose groups at day 2, and for these groups and the 1.50 mmol/kg group on all days from day 3 onwards. Body weights from animals exposed to 1.25 mmol/kg of *cis*-2-pentenenitrile did not differ significantly from control body weights at any time post-exposure.

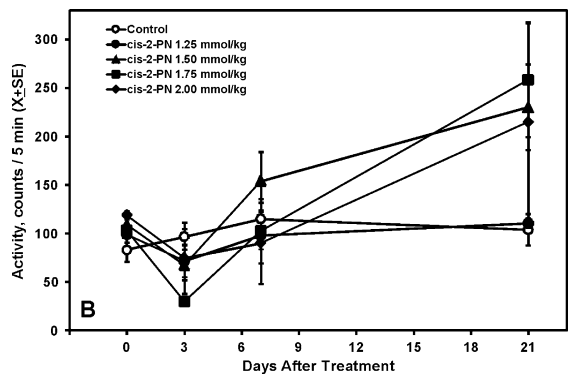
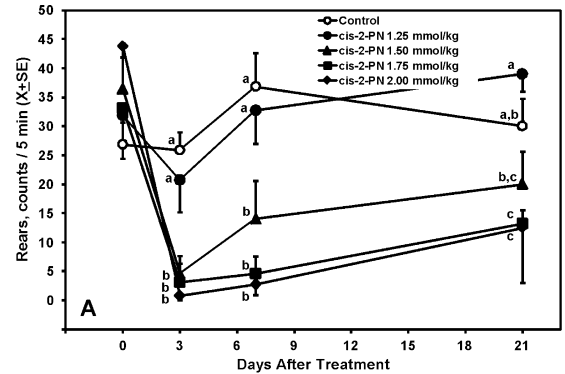


Fig. 2. Effects of *cis*-2-pentenenitrile on 5-min open field activity. Data are mean \pm SE. (A) Rearing activity. (a)–(c) groups not sharing a letter are significantly different, $p < 0.05$, Duncan's test after significant repeated-measures MANOVA and post hoc day by day analysis. (B) Horizontal locomotor activity (square crossings).

Other signs of toxicity in the *cis*-2-pentenenitrile animals were changes in spontaneous behavior related to vestibular dysfunction (see below) and reversible corneal opacity. Simple observation revealed a loss of corneal transparency on day 1 after dosing in animals treated with doses of 1.5 mmol/kg or greater. In the 1.5 mmol/kg animals, almost complete recovery was observed on day 2. Corneal opacity was observed up to day 6 in animals exposed to 2.0 mmol/kg.

3.2. Effects of *cis*-2-pentenenitrile on behavior

In the open field, a dose-dependent effect of *cis*-2-pentenenitrile on rearing activity of the rats was observed (Fig. 2A). MANOVA analysis revealed significant effects of day, $F(3, 24) = 21.5, p = 0.000$, day by treatment, $F(12, 64) = 3.5, p = 0.000$, and treatment, $F(4, 26) = 4.7, p = 0.005$. Significant group differences were detected on day 3, $F(4, 26) = 9.7, p = 0.000$, day 7, $F = 9.2, p = 0.000$, and day 21, $F = 6.0, p = 0.001$. The groups of animals dosed with 1.75 mmol/kg or 2.0 mmol/kg of *cis*-2-pentenenitrile showed reduced rearing activity at these three time points, while the 1.50 mmol/kg group showed significant differences from the control group at days 3 and 7 but not at day 21.

The effects of *cis*-2-pentenenitrile on horizontal activity in the open field are shown in Fig. 2B. MANOVA analysis resulted in a significant effect of day, $F(3, 24) = 17.6, p = 0.000$, and day by treatment, $F(12, 64) = 2.4, p = 0.014$. However, a high within group variability was present, and day by day analysis showed only marginal effects at day 3, $F(4, 26) = 2.6, p = 0.056$, and day 21, $F = 2.6, p = 0.06$.

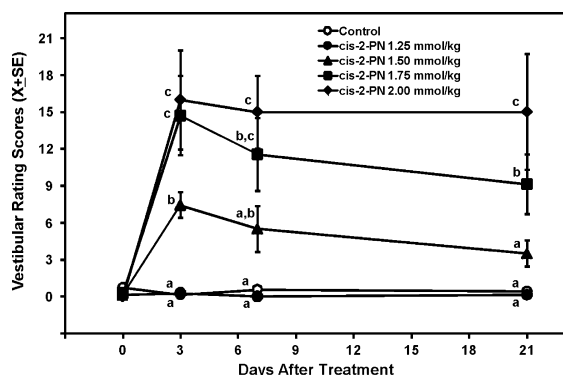


Fig. 3. Effects of *cis-2-pentenenitrile* on vestibular function. Data are mean \pm SE rating scores for vestibular dysfunction. (a)–(c) groups not sharing a letter are significantly different, $p < 0.05$, Duncan's test after significant repeated-measures MANOVA and post hoc day by day analysis.

At the latter time point it was evident that some of the rats dosed with 1.5 mmol/kg or more of *cis-2-pentenenitrile* were hyperactive. Thus, while values in the control group ranged from 31 to 147, values in the range of 213–492 were recorded from four out of six animals in the 1.50 mmol/kg group, five out of seven animals in the 1.75 mmol/kg group, and two out of four animals in the 2.0 mmol/kg group.

Exposure to *cis-2-pentenenitrile* resulted in a dose-dependent increase in vestibular rating scores, indicating loss of vestibular function (Fig. 3). Analysis of the test battery data indicated significant effects of day, $F(3, 24) = 21.2$, $p = 0.000$, day by treatment, $F(12, 64) = 4.6$, $p = 0.000$, and treatment, $F(4, 26) = 11$, $p = 0.000$. Significant group differences were detected at all the post-dosing experimental times, all $F_s(4, 26) > 8.5$, $p_s = 0.000$. The 1.25 mmol/kg of *cis-2-pentenenitrile* group showed no differences from controls, but doses of 1.50 mmol/kg or higher induced a significant loss of vestibular function which was larger in the groups receiving the highest doses.

3.3. Effects of *cis-2-pentenenitrile* on the vestibular sensory epithelia

SEM assessment of the control vestibular sensory epithelia (Fig. 4A) revealed no pathological alterations. The morphology agreed with that reported for normal adult rat epithelia (Csillag, 2005). The effects of *cis-2-pentenenitrile* are shown in Fig. 4, and

Table 1
Effects of *cis-2-pentenenitrile* on vestibular sensory epithelia: summary.

Allylnitrile (mmol/kg)	(n)	Vestibular epithelia		
		Crista	Utricle	Sacculle
0	(2)	0–1	0–1	0
1.25	(3)	0–1	0–1	0
1.50	(3)	1–3	1–2	1
1.75	(4)	3–4	2	1–2
2.0	(2)	3–4	3	3–4

Data are arbitrary ratings after scanning electron microscopy observations of the sensory epithelia. Rats were given 0, 1.25, 1.5, 1.75, or 2.0 mmol/kg of *cis-2-pentenenitrile* and examined at 36–42 days after dosing. *n*, number of animals examined. Vestibular ratings: 0, no differences from literature descriptions of control adult tissue; 1, presence of hair bundles with abnormal configuration of stereocilia or lack of a few hair bundles in the central part of the receptor; 2, loss of hair bundles clearly evident at low magnifications but only in the central region of the receptor; 3, widespread loss of hair bundles, usually complete in the central part of the receptor, and evident in more peripheral areas; 4, complete or almost complete loss of hair bundles.

summarized in Table 1. The vestibular epithelia from animals exposed to 1.25 mmol/kg (Fig. 4B and C) showed no difference compared with those from control animals, although minor effects cannot be completely ruled out at the level of observation used. Animals exposed to larger doses of *cis-2-pentenenitrile* showed significant evidence of hair cell loss, up to complete loss of hair bundles in the sensory epithelia (Fig. 4D–F). When comparing animals one by one, animals with higher scores on the behavioral test battery for vestibular dysfunction showed more extensive loss of hair bundles in the epithelia.

3.4. Effects of 1-aminobenzotriazole on the vestibular toxicity of *cis-2-pentenenitrile*

Co-administration of the animals with the universal cytochrome P450 inhibitor, 1-aminobenzotriazole, blocked the toxicity of *cis-2-pentenenitrile*. In this experiment, animals exposed to *cis-2-pentenenitrile* alone showed a loss of body weight that was maximal at day 2 after dosing, when their mean group weight was 90% of the initial value ($p < 0.05$, post hoc analysis after significant MANOVA day by treatment interaction, $F(10, 28) = 11.1$, $p = 0.000$). Animals co-administered with 1-aminobenzotriazole did not lose weight. Body weights at day 2 were 101% of the initial body weights in both the control and the aminobenzotriazole + *cis-2-pentenenitrile* groups.

Co-administration with 1-aminobenzotriazole specifically blocked the vestibular toxicity of *cis-2-pentenenitrile* exposure, as assessed by the behavioral test battery at day 7 after exposure. As shown in Fig. 5, animals administered both 1-aminobenzotriazole and *cis-2-pentenenitrile* did not develop the behavioral deficits associated with vestibular damage, in contrast to the effect observed in the animals treated with the nitrile alone. This conclusion was supported by the Duncan's test analysis ($p < 0.05$) after the ANOVA analysis demonstrated a significant group effect ($F(2, 18) = 10.9$, $p = 0.001$).

3.5. Effects of *cis-2-pentenenitrile* in the central nervous system

Control animals showed no Fluoro-Jade C staining (Fig. 6A and D). In the two positive control animals administered with hexadinenitrile, this stain revealed neuronal degeneration in several specific brain regions including the inferior olive and the piriform cortex (Fig. 6B), in agreement with previously published results (Boadas-Vaello et al., 2005; Seoane et al., 2005).

The rats exposed to 2.0 mmol/kg of *cis-2-pentenenitrile* only did not show consistent evidence of neuronal degeneration (Fig. 6C), although punctuate labeling was noticed in the olfactory glomeruli in two of the three rats examined (Fig. 6E). One of these animals also showed a very small focus of degenerating neurons in one side of the deepest layer (6b) of the somatosensory cortex. The third rat showed two small foci of neuronal degeneration: one in the cerebellum, where a Purkinje cell dendritic arborization and several neighboring granule cells were labeled, and a second one in the fimbria of the hippocampus. Both lesions were found in a single section and on one side only. In addition, a small group of axons were apparently labeled in this rat bilaterally in or near the internal capsule.

The rats administered with both 1-aminobenzotriazole and *cis-2-pentenenitrile* did not show Fluoro-Jade C staining (not shown).

4. Discussion

Several low molecular weight nitriles have been shown to have prominent neurotoxic effects, including the induction of degeneration of either the sensory hair cells of the inner ear or selected

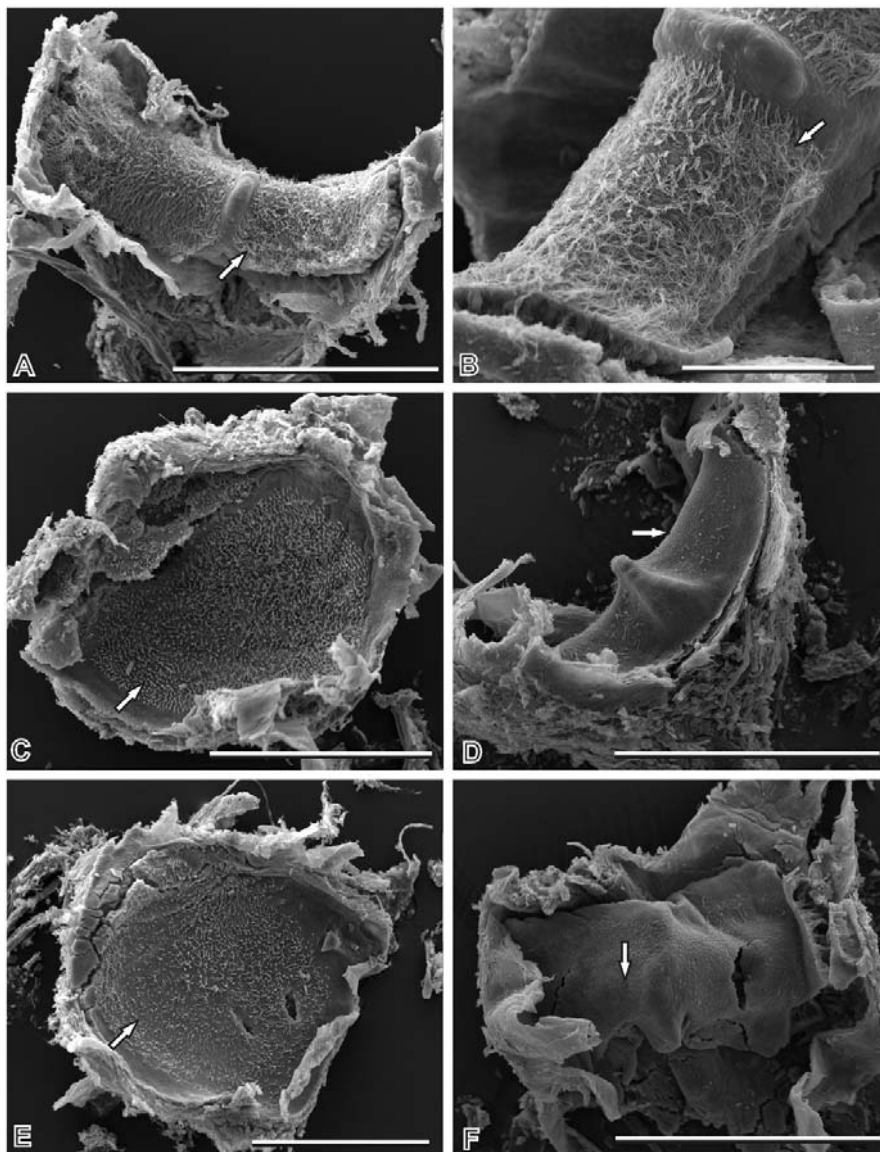


Fig. 4. Effects of *cis*-2-pentenitrile on the vestibular sensory epithelia, as assessed by scanning electron microscopy at 36–42 days after exposure. (A) Control crista. A dense covering (arrow) of hair bundles, each one corresponding to one vestibular hair cell, characterizes the sensory epithelium. (B) Crista from a 1.25 mmol/kg of *cis*-2-pentenitrile rat, showing control-like appearance. This rat had shown no evidence of vestibular dysfunction (rating score of 0 at day 21). Note the hairy appearance of stereocilia bundles (arrow). (C) Utricle from a 1.25 mmol/kg of *cis*-2-pentenitrile rat, showing control-like appearance. This rat had shown no evidence of vestibular dysfunction (rating score of 0 at day 21). In the utricles, stereocilia bundles (arrow) are shorter than in the cristas. (D) Crista from a 1.75 mmol/kg of *cis*-2-pentenitrile rat, showing a surface of the sensory epithelium (arrow) almost completely devoid of hair bundles. At day 21 this rat received a vestibular rating score of 16. (E) Utricle from a 1.75 mmol/kg of *cis*-2-pentenitrile rat, showing a noticeably reduced density of hair bundles (arrow). At day 21 this rat received a vestibular rating score of 11. (F) Crista from a 2.0 mmol/kg of *cis*-2-pentenitrile rat, representing the worst case example. No normal hair bundles remain in the sensory epithelium (arrow), and the acquired fragility of the tissue favored its distortion during manipulation. At day 21 this rat received a vestibular rating score of 20. Scale bars = 300 μ m in A, C–E; 100 μ m in B.

groups of central nervous system neurons. The nitriles that have been thoroughly assessed for these effects to date, including IDPN, allylnitrile, *cis*- and *trans*-crotonitrile, and hexadienenitrile, are of modest economic importance. In this study, we assessed the vestibular and central nervous system effects in the rat of *cis*-2-pentenitrile, a compound with a significant industrial occurrence (see Section 1).

Exposure of rats to *cis*-2-pentenitrile resulted in a dose-dependent effect on body weight; significant differences from control weights were recorded after doses of 1.50 mmol/kg or larger. Although not specifically addressed in this study, reversible effects were observed in the cornea, where opacity was evident after administration with doses of 1.50 mmol/kg or larger. Opacification of the cornea is a known effect of IDPN (Selye, 1957; Yamashita,

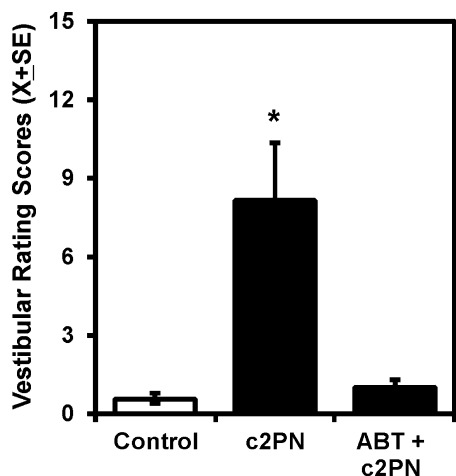


Fig. 5. Decrease due to 1-aminobenzotriazole co-treatment of the effect of *cis*-2-pentenitrile on vestibular function. Data are mean \pm SE rating scores for vestibular dysfunction at day 7 after exposure to control vehicles, *cis*-2-pentenitrile (c2PN) plus vehicle, or 1-aminobenzotriazole (ABT) plus *cis*-2-pentenitrile. *significantly different from the other two groups, $p < 0.05$, Duncan's test after significant ANOVA.

1973; Seoane et al., 1999), allylnitrile (Balbuena and Llorens, 2001), and *cis*-crotonitrile (Balbuena and Llorens, 2003), but is not observed in rats exposed to *trans*-crotonitrile or hexadienenitrile.

The behavioral effects of *cis*-2-pentenitrile were dose-dependent and included decreased rearing activity and increased rating scores in a test battery designed to assess vestibular dysfunction. Locomotor activity in the open field showed high variability, but some of the animals dosed with the higher doses of *cis*-2-pentenitrile were distinctly hyperactive. These effects are similar to those reported in rats exposed to IDPN (Llorens et al., 1993), allylnitrile (Balbuena and Llorens, 2001), and *cis*-crotonitrile (Balbuena and Llorens, 2003), and are a consequence of the loss of vestibular function (Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena and Llorens, 2003; Boadas-Vaello et al., 2005). Accordingly, our histological data demonstrated loss of the vestibular sensory hair cells and a good correlation between the behavioral and the pathological effects both at group and at individual level. We thus conclude that *cis*-2-pentenitrile causes a dose-dependent loss of vestibular hair cells in the rat with a lowest effective dose of 1.5 mmol/kg after oral acute exposure. These data confirm and extend the previously available behavioral evidence for this effect (Tani et al., 1989; Genter and Crofton, 2000; Lewis et al., 2006; Saldaña-Ruiz et al., 2012) and complement the

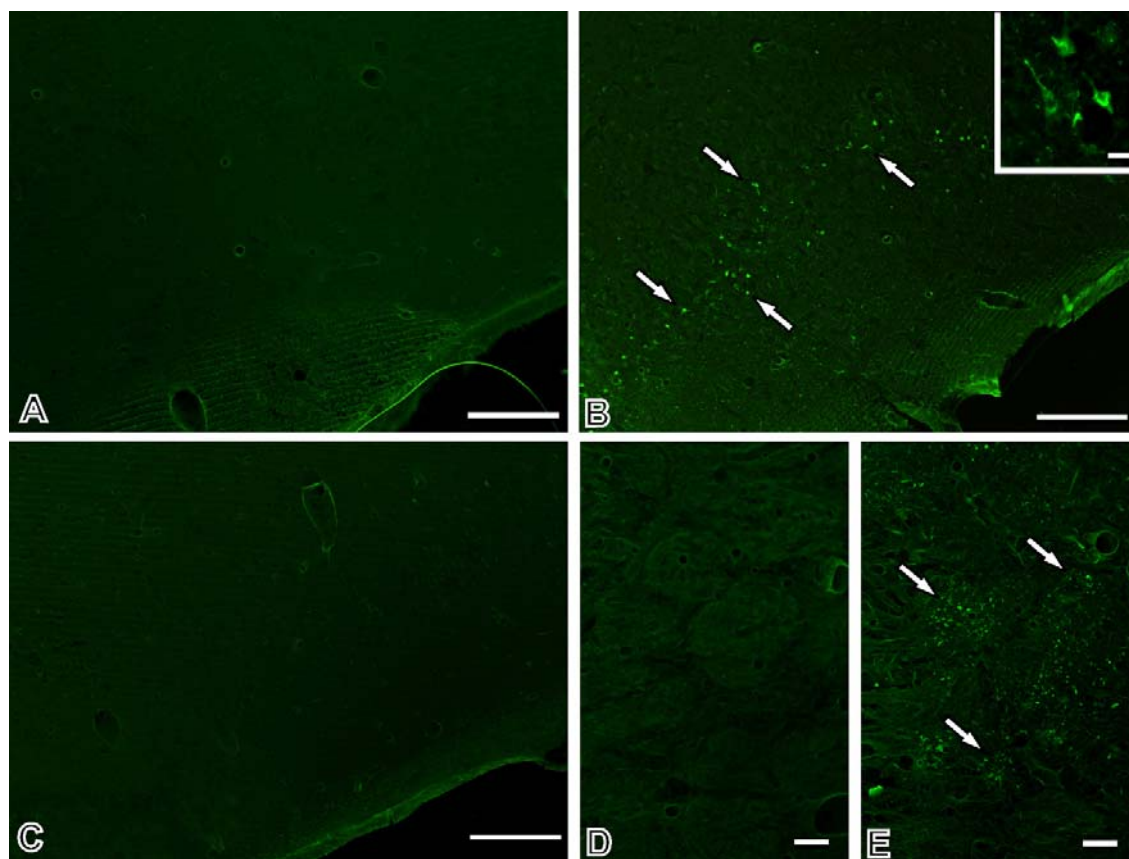


Fig. 6. Effects of *cis*-2-pentenitrile on the central nervous system, as assessed by Fluoro-Jade C staining of degenerating neurons at 7 days after exposure. (A) Control brain, piriform cortex region, showing no Fluoro-Jade C staining. (B) Positive control section, piriform cortex region of a rat exposed to hexadienenitrile. Labeled neurons were observed in the whole layer (arrows). The inset shows a higher magnification of the degenerating neurons. (C) The same region in a *cis*-2-pentenitrile rat. No Fluoro-Jade C labeling was observed. (D) Glomerular layer of the olfactory bulb of a control rat. (E) Glomerular layer of the olfactory bulb of a *cis*-2-pentenitrile rat. Note the punctuate Fluoro-Jade C deposits (arrows). Scale bars = 100 μ m in A–C; 25 μ m in D, and E; 10 μ m in the inset in B.

available data on the auditory toxicity of this nitrile (Gagnaire et al., 2001).

The features of the vestibular lesions observed by scanning electron microscopy were remarkably similar to the ones reported previously for the other ototoxic nitriles (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Balbuena and Llorens, 2001, 2003), and were also congruent with the “classic” pattern of vestibular toxicity defined by aminoglycoside antibiotics (Forge and Schacht, 2000). This pattern is characterized by an earlier hair cell loss in the central part of the vestibular sensory epithelia progressing towards the periphery with increasing doses, as well as a greater susceptibility of the crista receptors in comparison to the maculae.

We used co-administration of 1-aminobenzotriazole to assess whether the vestibular toxicity of *cis*-2-pentenenitrile depends on cytochrome P450 (CYP)-mediated bioactivation. Although the results of a pharmacological experiment *in vivo* should be considered with caution because of the possibility of unspecific effects, 1-aminobenzotriazole is well known as a specific and effective universal CYP inhibitor (Mico et al., 1988). Therefore, the diminished toxicity of *cis*-2-pentenenitrile observed after aminobenzotriazole most likely resulted from the reduced formation of the ototoxic metabolite(s) of the nitrile. Evidence that the vestibular toxicity depends on CYP bioactivation is also available for allylnitrile (Boadas-Vaello et al., 2009), but the ototoxic metabolite has not been identified. In the case of IDPN, the data available support the conclusion that flavin monooxygenase-mediated generation of N-hydroxy-IDPN is a bioactivation step (Morandi et al., 1987; Nace et al., 1997), but conclusive identification of the ototoxic metabolite is lacking.

In the central nervous system, vestibulotoxic doses of *cis*-2-pentenenitrile did not cause overt evidence of specific neuronal degeneration. The only consistent finding in more than one animal, the presence of punctuate fluoro-jade C deposits in the olfactory glomeruli, indicates axonal or dendritic degeneration. Toxicity to the olfactory mucosa has been reported for this nitrile (Genter and Crofton, 2000; Lewis et al., 2006), so degeneration of the incoming axons of the primary olfactory neurons probably accounts for the stain observed, as demonstrated with silver degeneration staining in the olfactory glomeruli of rats treated with IDPN (Genter et al., 1992). Other findings in *cis*-2-pentenenitrile rats were inconsistent; they were found in only one rat, and did not show bilateral symmetry except for a few axons in the internal capsula area. The occasional presence of local foci of degeneration, apparently not related to the specific neuronal degeneration presenting as bilateral lesions in all animals, has also been reported for hexadienenitrile (Boadas-Vaello et al., 2005). The lack of consistent central nervous system toxicity in *cis*-2-pentenenitrile was not modified after aminobenzotriazole co-treatment, which probably increased the circulating concentrations of the parent molecule.

In conclusion, the present study characterized the vestibular toxicity of acute oral exposure to *cis*-2-pentenenitrile in the rat. Vestibular toxicity was found at doses of 1.5 mmol/kg and larger, and with similar characteristics to those previously determined for allylnitrile, *cis*-crotonitrile and IDPN.

Conflict of interest

Jordi Llorens is a member of the scientific advisory board of Sensorion Pharmaceuticals, a company that generates therapies for vestibular disorders.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Science and Innovation (Spain)/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (European

Union) [grant number BFU2009-06945] and by the Generalitat de Catalunya [grant number 2009 SGR 1059]. The SEM studies were performed at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona.

References

- Balbuena, E., Llorens, J., 2001. Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Research* 904, 298–306.
- Balbuena, E., Llorens, J., 2003. Comparison of *cis*- and *trans*-crotonitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187, 89–100.
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., Llorens, J., 2005. Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicological Sciences* 88, 456–466.
- Boadas-Vaello, P., Jover, E., Saldaña-Ruiz, S., Soler-Martín, C., Chabbert, C., Bayona, J.M., Llorens, J., 2009. Allylnitrile metabolism by CYP2E1 and other CYPs leads to distinct lethal and vestibulotoxic effects in the mouse. *Toxicological Sciences* 107, 461–472.
- Crofton, K.M., Janssen, R., Prazma, J., Pulver, S., Barone Jr., S., 1994. The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hearing Research* 80, 129–140.
- Csillag, A., 2005. Atlas of the Sensory Organs. Functional and Clinical Anatomy. Humana Press, Totowa (NJ).
- DeVito, S.C., 1996. Designing safer nitriles. In: DeVito, S.C., Garrett, R.L. (Eds.), *Designing Safer Chemicals*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 194–223.
- DeVito, S.C., 2007. Nitriles. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, <http://dx.doi.org/10.1002/0471238961.1409201813031109>.
- Forge, A., Schacht, J., 2000. Aminoglycoside antibiotics. *Audiology & Neuro-Otology* 5, 3–22.
- Gagnaire, F., Marignac, B., Ban, M., Langlais, C., 2001. The ototoxic effects induced in rats by treatment for 12 weeks with 2-butenitrile, 3-butenitrile and *cis*-2-pentenenitrile. *Pharmacology & Toxicology* 88, 126–134.
- Genter, M.B., Crofton, K.M., 2000. Pentenenitrile. In: Spencer, P.S., Schaumburg, H.H. (Eds.), *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Oxford University Press, New York, pp. 968–969.
- Genter, M.B., Llorens, J., O'Callaghan, J.P., Peele, D.B., Morgan, K.T., Crofton, K.M., 1992. Olfactory toxicity of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN) in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 263, 1432–1439.
- Lewis, J.M., Maslanka, J.C., Malley, L.A., Everds, N.E., Mann, P.C., Kennedy Jr., G.L., 2006. Oral toxicity study of 2-pentenenitrile in rats with reproductive toxicity screening test. *Drug and Chemical Toxicology* 29, 345–361.
- Llorens, J., Demêmes, D., Sans, A., 1993. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 123, 199–210.
- Llorens, J., Demêmes, D., 1994. Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia. *Hearing Research* 76, 78–86.
- Llorens, J., Rodríguez-Farré, E., 1997. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicology and Teratology* 19, 117–127.
- Llorens, J., Aguiló, A., Rodríguez-Farré, E., 1998. Behavioral disturbances and vestibular pathology following crotonitrile exposure in rats. *Journal of the Peripheral Nervous System* 3, 189–196.
- Llorens, J., Soler-Martín, C., Saldaña-Ruiz, S., Cutillas, B., Ambrosio, S., Boadas-Vaello, P., 2011. A new unifying hypothesis for lathyrism, konzo and tropical ataxic neuropathy: nitriles are the causative agents. *Food and Chemical Toxicology* 49, 563–570.
- Mico, B.A., Federowicz, D.A., Ripple, M.G., Kerns, W., 1988. *In vivo* inhibition of oxidative drug metabolism by, and acute toxicity of, 1-aminobenzotriazole (ABT). A tool for biochemical toxicology. *Biochemical Pharmacology* 37, 2515–2519.
- Morandi, A., Gambetti, P., Arora, P.K., Sayre, L.M., 1987. Mechanism of neurotoxic action of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN): N-hydroxylation enhances neurotoxic potency. *Brain Research* 437, 69–76.
- Nace, C.G., Genter, M.B., Sayre, L.M., Crofton, K.M., 1997. Effect of methimazole, an FMO substrate and competitive inhibitor, on the neurotoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in male rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 37, 131–140.
- Paxinos, G., Carrive, P., Wang, H., Wang, P.-Y., 1999a. Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brainstem. Academic Press, San Diego.
- Paxinos, G., Kus, L., Ashwell, K.W.S., Watson, C., 1999b. Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Forebrain. Academic Press, San Diego.
- Saldaña-Ruiz, S., Soler-Martín, C., Llorens, J., 2012. Role of CYP2E1-mediated metabolism in the acute and vestibular toxicities of nineteen nitriles in the mouse. *Toxicology Letters* 208, 125–132.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000a. Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicologic Pathology* 28, 91–99.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000b. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 874, 123–130.
- Schmued, L.C., Stowers, C.C., Scallet, A.C., Xu, L., 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Research* 1035, 24–31.

- Selye, H., 1957. Lathyrism. *Revue Canadienne de Biologie* 16, 1–82.
- Seoane, A., Espejo, M., Pallàs, M., Rodríguez-Farré, E., Ambrosio, S., Llorens, J., 1999. Degeneration and gliosis in rat retina and central nervous system following 3,3'-iminodipropionitrile exposure. *Brain Research* 833, 258–271.
- Seoane, A., Demêmes, D., Llorens, J., 2001a. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *Journal of Comparative Neurology* 439, 385–399.
- Seoane, A., Demêmes, D., Llorens, J., 2001b. Pathology of the rat vestibular sensory epithelia during subchronic 3,3'-iminodipropionitrile exposure: hair cells may not be the primary target of toxicity. *Acta Neuropathologica* 102, 339–348.
- Seoane, A., Aps, R., Balbuena, E., Herrero, L., Llorens, J., 2005. Differential effects of transcrotonitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *European Journal of Neuroscience* 22, 880–894.
- Soler-Martín, C., Díez-Padrisa, N., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2007. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicological Sciences* 96, 123–132.
- Tanii, H., Kurosaka, Y., Hayashi, M., Hashimoto, K., 1989. Allylnitrile: a compound which induces long-term dyskinesia in mice following a single administration. *Experimental Neurology* 103, 64–67.
- Yamashita, S., 1973. Studies on the ocular changes of experimental lathyrism. 2. Electron microscopic observations on epithelial, stromal and endothelial cells of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN)-treated rat cornea. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 77 (8), 834–847.

Research Article

Reduced Systemic Toxicity and Preserved Vestibular Toxicity Following Co-treatment with Nitriles and CYP2E1 Inhibitors: a Mouse Model for Hair Cell Loss

SANDRA SALDAÑA-RUIZ,^{1,2} PERE BOADAS-VAELLO,³ LARA SEDÓ-CABEZÓN,^{1,2} AND JORDI LLORENS^{1,2}

¹*Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain*

²*Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain*

³*NEOMA Research Group, Departament de Ciències Mèdiques, Facultat de Medicina, Universitat de Girona, Catalonia, Spain*

Received: 31 August 2012; Accepted: 14 May 2013; Online publication: 8 June 2013

ABSTRACT

Several nitriles, including allylnitrile and *cis*-crotononitrile, have been shown to be ototoxic and cause hair cell degeneration in the auditory and vestibular sensory epithelia of mice. However, these nitriles can also be lethal due in large part to the microsomal metabolic release of cyanide, which is mostly dependent on the activity of the 2E1 isoform of the cytochrome P450 (CYP2E1). In this study, we co-administered mice with a nitrile and, to reduce their lethal effects, a selective CYP2E1 inhibitor: diallylsulfide (DAS) or *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE). Both in female 129S1/SvImJ (129S1) mice co-treated with DAS and *cis*-crotononitrile and in male RjOrl:Swiss/CD-1 (Swiss) mice co-treated with TDCE and allylnitrile, the nitrile caused a dose-dependent loss of vestibular function, as assessed by a specific behavioral test battery, and of hair cells, as assessed by hair bundle counts using scanning electron microscopy. In the experiments, the CYP2E1 inhibitors provided significant protection against the lethal effects of the nitriles and did not diminish the vestibular toxicity as assessed by behavioral effects in comparison to

animals receiving no inhibitor. Additional experiments using a single dose of allylnitrile demonstrated that TDCE does not cause hair cell loss on its own and does not modify the vestibular toxicity of the nitrile in either male or female 129S1 mice. In all the experiments, high vestibular dysfunction scores in the behavioral test battery predicted extensive to complete loss of hair cells in the utricles. This provides a means of selecting animals for subsequent studies of vestibular hair cell regeneration or replacement.

Keywords: ototoxicity, vestibular toxicity, allylnitrile, *cis*-crotononitrile, mouse, hair cell ablation

INTRODUCTION

The sensory epithelia of the mammalian inner ear have null or limited capacity for regeneration of the mechanotransducer hair cells. Thus, permanent auditory and balance deficits may result from hair cell loss due to a variety of causes, including genetic factors, aging, noise, head trauma, and exposure to ototoxic substances. Nowadays, significant research efforts are directed at replacing the lost hair cells through cell implant strategies or stimulation of hair cell regeneration in damaged ears. Prophylactic treatments that can prevent hair cell degeneration are also a focus of interest. These studies require dependable animal models of hair cell loss and,

Sandra Saldaña-Ruiz and Pere Boadas-Vaello contributed equally to this work.

Correspondence to: Jordi Llorens · Departament de Ciències Fisiològiques II · Universitat de Barcelona · Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain. Telephone: +34-93-4024277; fax: +34-93-4024268; email: jllorens@ub.edu

particularly, tend to use mice models, owing to the availability of probes, antibodies, and genetic tools for this species.

In several species, such as the guinea pig, hair cell degeneration is commonly achieved by exposing animals to aminoglycoside antibiotics, a group of compounds that are well known for their ototoxic effects in humans (Forge and Schacht 2000). However, mice are particularly resistant to hair cell degeneration induced by systemic aminoglycoside administration. For instance, a recent study aimed at refining ototoxicity models in the mouse found it necessary to dose mice with intramuscular kanamycin every 12 h for 15 days to obtain significant auditory loss with moderate (30 %) mortality, while even less favorable outcomes were obtained with gentamycin, amikacin, and neomycin (Murillo-Cuesta et al. 2009). Extensive ototoxic damage with limited systemic toxicity can be achieved by intratympanic aminoglycoside administration (Heydt et al. 2004; Ishibashi et al. 2009), but this mode of administration involves surgery or a delicate trans-tympanic administration that often results in highly variable lesions. To reliably produce acute cochlear lesions, potentiation of kanamycin ototoxicity using the loop diuretics furosemide (Oesterle et al. 2008) or bumetanide (Taylor et al. 2008) has been successful. However, this approach offers limited flexibility for cochlear studies and leaves the vestibular system totally unaffected.

Over the last 20 years, several nitriles, compounds containing cyano (R-CN) groups, have been shown to be ototoxic in animal models. Hair cell loss has been found in the vestibular and auditory epithelia of rats and mice after exposure to 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) (Llorens et al. 1993; Llorens and Demêmes 1994; Crofton et al. 1994), allylnitrile (Balbuena and Llorens 2001; Gagnaire et al. 2001), crotonitrile (Gagnaire et al. 2001; Llorens et al. 1998), and *cis*-2-pentenitrile (Gagnaire et al. 2001; Saldaña-Ruiz et al. 2012a, b). In the case of crotonitrile, only the *cis*-isomer is ototoxic in rats and mice (Balbuena and Llorens 2003; Soler-Martín et al. 2007), while *trans*-crotonitrile is ototoxic at sublethal levels in mice (Saldaña-Ruiz et al. 2012a) but not in rats (Boadas-Vaello et al. 2005). The ototoxic properties of nitriles have many features in common with those of aminoglycoside antibiotics. Like the antibiotics, the ototoxic nitriles affect both the auditory and the vestibular system (Llorens et al. 1993; Crofton et al. 1994; Balbuena and Llorens 2001; Soler-Martín et al. 2007) and show selectivity for hair cells as the primary target (Llorens and Demêmes 1994). Another similar feature is the susceptibility of multiple mammalian and non-mammalian species (Soler-Martín et al. 2007). Finally, the nitriles also resemble the antibiotics in the characteristic intra-epithelial and inter-epithelial differences in susceptibility: the hair cell loss

progresses in a basal to apical order in the cochlea, in a central to peripheral order within each vestibular epithelia, and in a crista>utricle>sacculle order across the vestibular epithelia (Llorens et al. 1993; Llorens and Demêmes 1994; Balbuena and Llorens 2001, 2003; Soler-Martín et al. 2007). Thus, nitriles may be a good tool for causing hair cell degeneration in the mouse auditory and vestibular epithelia.

Among the ototoxic nitriles, IDPN is a reliable and easy-to-use tool for hair cell lesioning. IDPN offers a wide window of ototoxic doses with no associated mortality (Llorens et al. 1993; Llorens and Demêmes 1994), great flexibility in effective dosing regimens (Llorens and Rodríguez-Farré 1997; Seoane et al. 2001a, b), and can be used across different species, including rats, mice, guinea pigs, and frogs (Soler-Martín et al. 2007). IDPN has been used to achieve vestibular lesions in some functional or regeneration studies (Brueckner et al. 1999; Khan et al. 2004; Brugeaud et al. 2007; Schlecker et al. 2011). However, the use of IDPN as a model vestibular toxin is sometimes hampered by the concurrence of its well-known toxic effect on neurofilament transport. IDPN causes a reduction in the axonal neurofilament transport rate (Griffin et al. 1978), which is associated with axonal swelling in the proximal internodal segments of large myelinated axons (Chou and Hartmann 1964), and neurofilament accumulation in the vestibular ganglion neuronal perikarya (Llorens and Demêmes 1996).

Unlike IDPN, allylnitrile and *cis*-crotonitrile seem to have little or no potential to cause neurofilamentous axonopathy (Llorens et al. 1998; Soler-Martín et al. 2011). However, their high acute toxicity often leads to mortality and makes them unsuitable as selective ototoxic tools. We have recently reported that the acute toxicity of these two nitriles is largely due to cyanide release from the parent nitriles through metabolism by the 2E1 isoform of cytochrome P450 (CYP2E1), as demonstrated by reduced mortality in CYP2E1-null mice. In contrast, the vestibular toxicity of these compounds remains unchanged in CYP2E1-null mice (Boadas-Vaello et al. 2007, 2009; Saldaña-Ruiz et al. 2012a). As control experiments in those studies, we hypothesized that pharmacological inhibition of CYP2E1 in wild-type mice would reduce the acute toxicity of these nitriles, but not their vestibular toxicity. Accordingly, we obtained behavioral evidence demonstrating the hypothesized effect in mice exposed to allylnitrile and co-treated with the CYP2E1 inhibitor diallylsulfide (DAS) (Boadas-Vaello et al. 2009). The aim of the present work is to extend those preliminary data via a complete behavioral and histological assessment, thus paving the way for the use of these nitriles in studies requiring hair cell ablation in mice. To this end, we performed four experiments to test the protection from

acute toxicity and the loss of vestibular function and hair cells and to establish the relationship between the functional and histological alterations. Because sex differences have been found in nitrile metabolism and toxicity in mice (Chanas et al. 2003; Boadas-Vaello et al. 2007; Saldaña-Ruiz et al. 2012a), only one sex was used in each of the experiments reported here. Vestibular lesions were successfully obtained in both sexes and also in two different strains of mice.

METHODS

Chemicals and reagents

Allylnitrile (>98 %) was purchased from Merck-Schuchard (Hohenbrunn bei München, Germany) and DAS (97 %) and *trans*-1,2-dichloroethylene (98 %) (TDCE) from Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). *cis*-Crotononitrile was obtained by fractional distillation from a commercially available racemic mixture (99 %, *cis/trans* ratio of approximately 60:40, Aldrich Química, Alcobendas, Spain), as previously described (Balbuena and Llorens 2003). Fractions with an isomeric purity greater than 97 % (by $[1H]$ -NMR, 300 MHz, using $CDCl_3$ as the solvent in a Varian Unity 300 spectrometer) were used in the present series of experiments. Other chemicals were of analytical grade, as obtained from common commercial sources.

Animals

Animal care and use were in accordance with Acts 5/1995 and 214/1997 of the regional authorities ("Generalitat") of Catalonia and approved by the Commission on Animal Experimentation. Two different strains were evaluated, and only one sex was used in each of the experiments. In one experiment, we used male RjOrl:Swiss/CD-1 (Swiss) mice purchased from Janvier (Le-Genest-Saint-Isle, France). In other experiments, we used male or female 129S1/SvImJ (129S1) mice from a local colony established by breeding pairs obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were housed two to four per cage in standard Macrolon cages (28×28×15 cm) with wood shavings as bedding. They were given standard diet pellets (Harlan Teklad Global Diet 2014) ad libitum. For the histological study, mice were anesthetized with 400 mg kg⁻¹ chloral hydrate and decapitated. The temporal bones were then directly immersed in cold fixative solution for immediate dissection of the vestibular sensory epithelia.

Dosing and experimental protocol

Allylnitrile and *cis*-crotononitrile were administered p.o. in 6 ml/kg of corn oil. Nitrile dose selection was

based on our previous data (Boadas-Vaello et al. 2007, 2009; Saldaña-Ruiz et al. 2012a). The selective CYP2E1 inhibitor DAS (Brady et al. 1991) was administered p.o. in 6 ml/kg of corn oil; DAS acts as a competitive inhibitor of CYP2E1 and is also metabolized to suicide inhibitors of the same enzyme. Another suicide inhibitor selective for CYP2E1, TDCE (Lilly et al. 1998; Mathews et al. 1998), was administered i.p. in 6 ml/kg of corn oil.

Initially, two dose-response experiments were run in three parts each, with two to four animals per treatment condition in each part. Then, a further two experiments using a single dose of the nitrile were run. In the first dose-response experiment, female 129S1 mice received 0, 1.75, 2.25, 2.75, or 3.25 mmol/kg of *cis*-crotononitrile 2 h after administration of DAS at 0 (corn oil, vehicle control) or 200 mg/kg. In contrast to our previous study (Boadas-Vaello et al. 2009), only one dose of DAS was administered, because the use of three doses had been observed to cause significant toxic effects. In the 3.25+ oil group, only the four animals in the first part of the experiment were dosed because of the high mortality recorded among them.

In the second dose-response experiment, male Swiss mice received 0, 1.0, 1.25, or 1.5 mmol/kg of allylnitrile and TDCE at 0 (corn oil, vehicle control) or 100 mg/kg, administered 30 min before and 6 and 24 h after administration of allylnitrile. The use of three doses was chosen to ensure the maximal effect of TDCE over the time period of allylnitrile ototoxicity, according to data in the literature (Mathews et al. 1998).

In the third experiment (the first of the two single-dose experiments), male 129S1 mice received 0 or 1.0 mmol/kg of allylnitrile and 3× TDCE at 0 or 100 mg/kg at the same times as above. In the fourth and last experiment, female 129S1 mice received 0 or 1.5 mmol/kg of allylnitrile and 3× TDCE at 0 or 100 mg/kg.

The animals were observed daily for 3–4 days and at least twice a week afterwards and rated for overall toxicity. The animals were killed if they met the criteria of the ethical limits of suffering. Animals that were killed were considered for data analysis in the same way as those that died spontaneously. Vestibular dysfunction was assessed 2–3, 7, and 21 days after nitrile exposure, and histological analysis was performed 4–5 weeks after dosing. In our experience (Llorens et al. 1993; Balbuena and Llorens 2001, 2003; Soler-Martín et al. 2007; Boadas-Vaello et al. 2007, 2009), no significant change in scores of vestibular dysfunction occurs between 3 and 4 weeks post-dosing in rats and mice with high scores that reflect severe dysfunction.

Behavioral analysis of vestibular function

The alteration of vestibular function was determined using a battery of behavioral tests, as previously

reported (Soler-Martín et al. 2007; Boadas-Vaello et al. 2007, 2009; Saldaña-Ruiz et al. 2012a). The same experimenter was responsible for dosing and behavioral analysis. However, animals were assigned to group treatments in a pseudorandom order and the rating sheets did not contain treatment information, so the experimenter performed the behavioral assessment under blind conditions. Briefly, the mice were placed for 1 min in an open arena (a rat cage) and the experimenter rated the animals from 0 (normal behavior) to 4 (maximal deficit in behavior) for circling, retropulsion, and abnormal head movements. Circling was defined as stereotyped circulatory ambulation. Retropulsion consisted of backward movement. Abnormal head movements consisted of intermittent extreme backward extension of the neck. The mice were then rated from 0 to 4 for the tail hang reflex, contact inhibition of the righting reflex, and air righting reflex tests. When lifted by the tail, normal mice exhibit a "landing" response consisting of forelimb extension. Mice with impaired vestibular function bend ventrally, sometimes "crawling" up towards their tails, thus tending towards occipital landing. For contact inhibition of the righting reflex, mice were flipped supine on a horizontal surface and a rigid plastic board was lightly placed in contact with the soles of their feet. Healthy mice quickly right themselves, but vestibular-deficient mice lie on their back, with their feet up and "walk" with respect to the ventral surface. For the air righting reflex, the animals were dropped supine from a height of 10 cm onto a foam cushion. Normal mice are able to right themselves in the air, whereas vestibular-deficient mice are not. A summary score of vestibular dysfunction was obtained by adding up the scores for all the behavior patterns.

Histology

We examined surface preparations of the vestibular sensory epithelia using scanning electron microscopy (SEM), following standard procedures as described elsewhere (Soler-Martín et al. 2007; Boadas-Vaello et al. 2007, 2009; Saldaña-Ruiz et al. 2012a). Briefly, the temporal bones were obtained and immediately immersed in ice-cold 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), and the sensory vestibular epithelia were quickly dissected. The samples were fixed for 1.5 h in the same solution, post-fixed for 1 h in 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer, dehydrated with increasing concentrations of ethanol up to 100 %, and dried in a critical point dryer using liquid CO₂. The dried sensory epithelia were coated with gold and observed in a Quanta-200 SEM (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). To evaluate hair cell loss, hair bundles were counted in representative

images of the central part of the utricle with the assistance of ImageJ software (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). In optimally preserved utricles, complete counts were obtained from images of large areas such as those shown in Figure 9, but smaller areas, such as those shown in Figure 4, were used if the larger ones included parts that could not be counted because the utricle was damaged or was partially covered with the otoconial membrane or debris.

Statistics

Mortality data are shown as the percentage of dead animals. The effect of DAS or TDCE on the survival of mice exposed to high doses of the nitriles was analyzed by Kaplan–Meier analysis using the Breslow statistic. Behavioral data are shown as mean \pm standard error of raw scores of vestibular dysfunction. These data were tested with repeated measures MANOVA (Wilks' criterion) with the day as the within-subject factor. Orthogonal contrasts followed by Duncan's test were used for post hoc analysis. Hair cell bundle counts were normalized as the percentage of the mean control value in the same experiment, to facilitate comparisons across experiments, and are shown as mean \pm standard error. These data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's test for post hoc analysis. In all analyses, the PASW 18.0 for Windows software package was used.

RESULTS

Dose-dependent effects of *cis*-crotononitrile and DAS on female 129S1 mice

Female 129S1 mice exposed to *cis*-crotononitrile displayed acute toxicity, including weight loss and death (Fig. 1). Co-treatment with DAS partially reduced this acute toxicity. Thus, survival after 2.75 mmol/kg of *cis*-crotononitrile was increased from three out of eight to seven out of eight by DAS co-treatment ($\chi^2_{(1)}=5.184$, $P=0.023$). However, only partial protection was afforded, since similar high mortality rates were observed after 3.25 mmol/kg of *cis*-crotononitrile both in groups of animals co-treated with DAS and those that were not. The decrease in acute toxicity was also observed in the body weight data, which showed a maximal reduction of the mean group value of 18 % after the high *cis*-crotononitrile dose without DAS co-treatment and of 13 % when the same dose of the nitrile was given with DAS co-treatment (data not shown).

cis-Crotononitrile caused a dose-dependent increase in the scores of vestibular dysfunction in female 129S1 mice whether co-treated with DAS or not

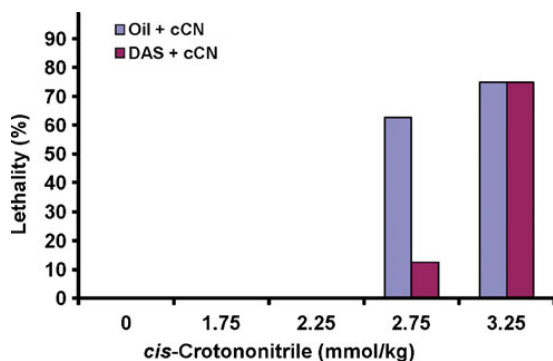


FIG. 1. Effect of co-treatment with the CYP2E1 inhibitor, diallylsulfide (DAS), on the acute toxicity of *cis*-crotononitrile (cCN) in 129S1 female mice.

(Fig. 2). The surviving animals in the 3.25 mmol/kg of *cis*-crotononitrile groups showed high scores (>17), but were excluded from the analysis due to the small group size. In the remaining groups, an analysis of the test battery data indicated significant effects of day, $F_{(3, 48)}=19.3$, $P=0.000$; day by treatment, $F_{(21, 138)}=2.5$, $P=0.001$; and treatment, $F_{(7, 50)}=8.5$, $P=0.000$. Significant group differences were detected at all the post-dosing experimental times, all $F_{S(7, 56)}>6.8$, $P_s=0.000$. The 1.75 mmol/kg of *cis*-crotononitrile groups showed no differences from controls, but doses of 2.25 and 2.75 mmol/kg induced a significant loss of vestibular function, which was larger in the groups receiving the highest dose. Animals co-treated with DAS did not have lower scores than the animals receiving no co-treatment in any case.

The vestibular sensory epithelia of 18 animals co-treated with *cis*-crotononitrile and DAS were examined by SEM at 4–5 weeks after dosing. Control animals and

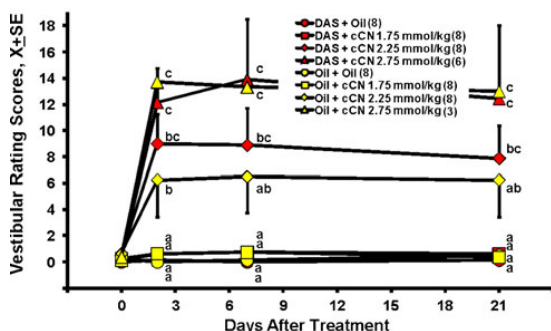


FIG. 2. Effects of *cis*-crotononitrile (0, 1.75, 2.25, and 2.75 mmol/kg) on the vestibular function test in 129S1 female mice with (red symbols) or without (yellow symbols) co-treatment with diallylsulfide (DAS). Numbers in parentheses are the number of animals. Data are the mean group vestibular rating scores \pm standard error. The maximum score is 24. a–c Groups not sharing a letter are significantly different, $P<0.05$, by Duncan's test.

animals administered with *cis*-crotononitrile that exhibited no alterations in behavior showed dense hair bundles from the sensory cells in the vestibular epithelia (Fig. 3A, B), with little or no difference from descriptions in the literature of control vestibular sensory epithelia (Csillag 2005; Soler-Martín et al. 2007). Hair bundle loss was observed in animals exposed to *cis*-crotononitrile with increased rating scores of vestibular dysfunction (Fig. 3C–F). Two animals

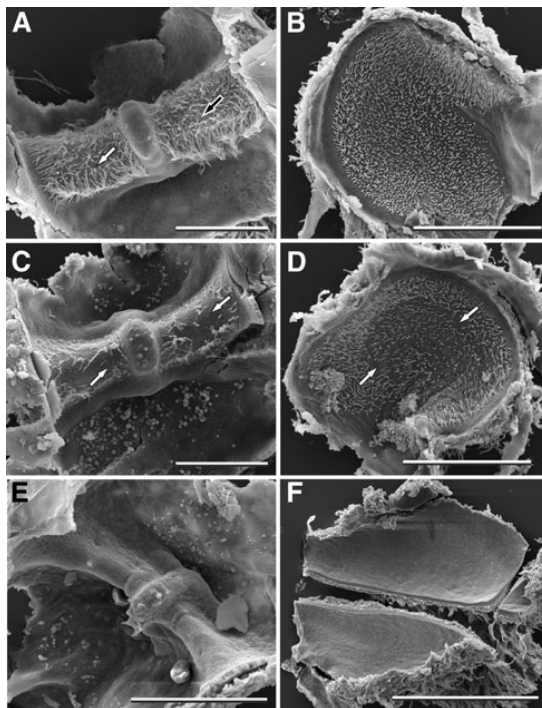


FIG. 3. Effects of *cis*-crotononitrile (1.75, 2.25, 2.75, and 3.25 mmol/kg) on the vestibular sensory epithelia of female 129S1 mice co-treated with diallylsulfide (DAS), as observed by SEM 4–5 weeks after exposure. **A** Crista of a mouse treated with 1.75 mmol/kg of *cis*-crotononitrile displaying no evidence of vestibular dysfunction (vestibular rating scores at days 7 and 21 were 1). Minor evidence of damage includes the lack of a few hair bundles (black arrow) and presence of a few coalescent ciliary bundles (white arrow) in the apical part of the crista. However, the density of hair bundles and overall appearance of the sensory epithelium were similar to those of control mice. **B** Utricule of the same mouse as in **A**. Note the regular distribution of hair bundles over the surface of the sensory epithelium. **C** Crista of a mouse treated with 2.75 mmol/kg of *cis*-crotononitrile displaying moderate loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 7). Note the extensive loss of hair cell bundles. **D** Utricule of the same mouse as in **C**, displaying evident loss of hair cell bundles. **E** Crista of a mouse treated with 2.75 mmol/kg of *cis*-crotononitrile, displaying major loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 19). Virtually, no hair cell bundles remain in the epithelium. **F** Utricule of another mouse treated with 2.75 mmol/kg of *cis*-crotononitrile, displaying major loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 18). Virtually, no hair cell bundles remain in the epithelium, which became more fragile and split into two halves during final manipulation. Scale bars=100 μ m in **A**, **C**, and **E**; 200 μ m in **B**, **D**, and **F**.

displayed moderate vestibular rating scores (6 and 7 at day 7) and moderate hair cell loss (Fig. 3C, D), while most showed no obvious behavioral and histological effect or nearly complete hair cell loss (Fig. 3E, F) in association with high (≥ 15) vestibular rating scores. Figure 4 shows the relationship between mean group behavioral scores at day 21 and mean group hair bundle counts.

Dose-dependent effects of allylnitrile and TDCE on male Swiss mice

TDCE reduced the acute toxicity of allylnitrile in male Swiss mice (Fig. 5). Thus, the mortality after 1.25 mmol/kg of allylnitrile was four out of eight with no TDCE co-treatment and 1/11 in co-treated animals ($\chi^2_{(1)}=3.134$, $P=0.077$). Based on previously published observations (Boadas-Vaello et al. 2009), we predicted excessive lethality after 1.50 mmol/kg of allylnitrile without TDCE co-treatment. However, we explored the response of the animals to this dose of allylnitrile with TDCE co-treatment. None of the four animals receiving 1.50 mmol/kg of allylnitrile and TDCE died or reached the ethical limits of suffering. These animals showed the greatest body weight effects, a moderate 10 % drop in body weight recorded at day 2 after dosing. Animals that received 1.25 mmol/kg of allylnitrile showed a maximal drop in body weight of only 5 % at day 1 after dosing (data not shown).

Allylnitrile caused a dose-dependent increase in scores of vestibular dysfunction in male Swiss mice whether co-treated with TDCE or not (Fig. 6). Analysis of the test battery data indicated significant effects of day, $F_{(3, 37)}=48.8$, $P=0.000$; day by treatment, $F_{(18, 105)}=4.2$, $P=0.000$; and treatment,

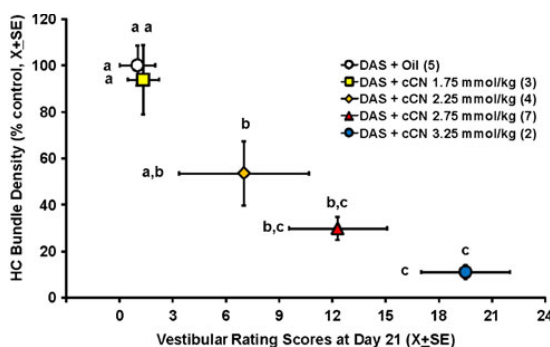


FIG. 4. Effects of *cis*-crotononitrile (0, 1.75, 2.25, 2.75, and 3.25 mmol/kg) on vestibular function and vestibular morphology in female 129S1 mice co-treated with diallylsulfide (DAS). Relationship between behavioral rating scores at day 21 and hair cell counts in the utricle. *a-c* Groups not sharing a letter are significantly different, $P < 0.05$, by Duncan's test, for histological (*above the symbol*) and behavioral (*on the left of the symbol*) data.

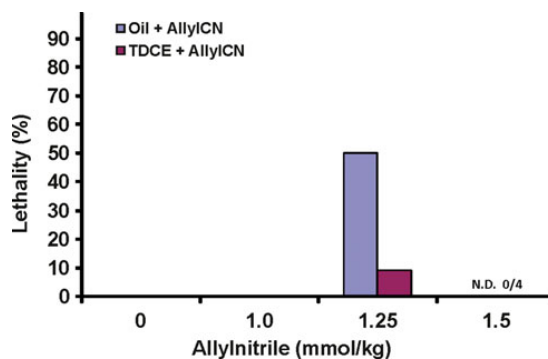


FIG. 5. Effect of co-treatment with the CYP2E1-inhibitor, *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE), on the acute toxicity of allylnitrile (AllylCN) in male Swiss mice. N.D. and 0/4: not determined, no animals were dosed with 1.5 mmol/kg without TDCE co-treatment; and dead/total at the same dose with TDCE co-treatment.

$F_{(6, 39)}=16.0$, $P=0.000$. Significant group differences were detected at all the post-dosing experimental times, all $F_{s(6, 39)} > 11.8$, $P_s=0.000$.

The vestibular sensory epithelia of 14 animals co-treated with TDCE and allylnitrile were examined by SEM 4–5 weeks after dosing. Control animals and animals administered with allylnitrile that had no alterations in behavior showed dense hair bundles from the sensory cells in the vestibular epithelia (Fig. 7A, B), as previously observed with the 129S1 female mice. However, one animal with control-like behavior in the test battery showed a noticeable loss of hair bundles in the apical region of the crista (Fig. 7C). Extensive to complete hair cell loss in cristas and utricles (Fig. 7E–H) was associated with high (≥ 12) scores

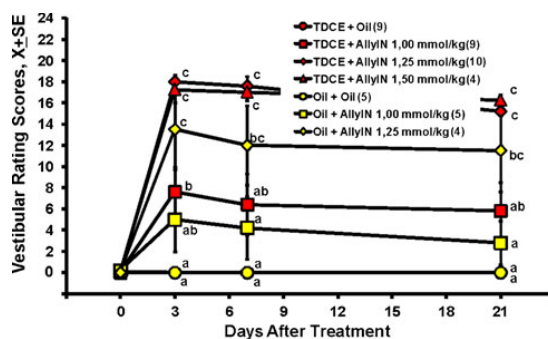


FIG. 6. Effects of allylnitrile (0, 1.0, 1.25, and 1.5 mmol/kg) on the vestibular function test in Swiss male mice, with (*red symbols*) or without (*yellow symbols*) co-treatment with *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE). Numbers in parentheses are the number of animals. Data are the mean group vestibular rating scores \pm standard error. The maximum score is 24. *a-c* Groups not sharing a letter are significantly different, $P < 0.05$, by Duncan's test.

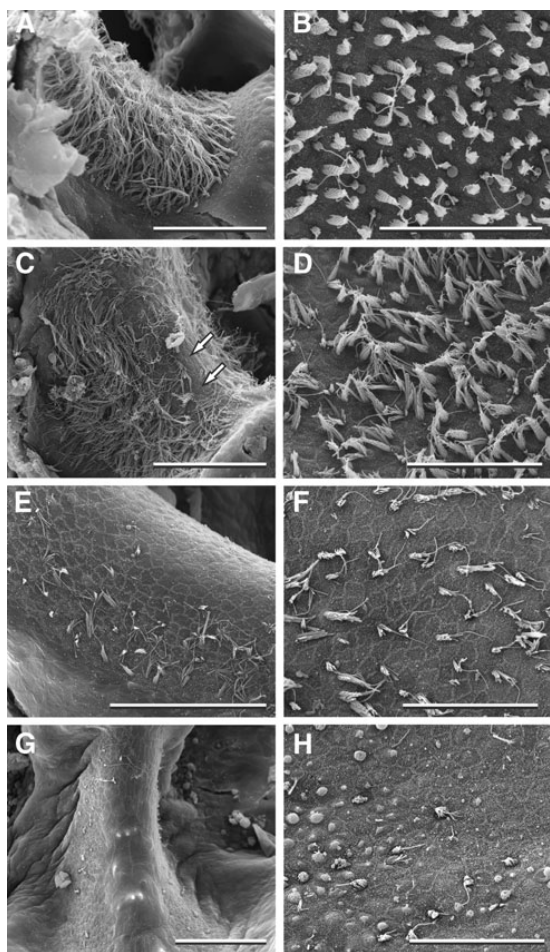


FIG. 7. Effects of allylnitrile (1.0, 1.25, and 1.50 mmol/kg) on the vestibular sensory epithelia of male Swiss mice co-treated with *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE), as observed by SEM 4–5 weeks after exposure. **A, B** Crista and utricle of a mouse treated with control vehicles and displaying no evidence of vestibular dysfunction (vestibular rating score at day 21 was 0). **C** Crista of a mouse treated with 1.0 mmol/kg of allylnitrile displaying no obvious loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 0). Note the significant loss of hair cell bundles in the apical part of the receptor. **D** Utricle of the same mouse as in **C**, displaying only scant loss of hair cell bundles. **E** Crista of a mouse treated with 1.25 mmol/kg of allylnitrile displaying a significant loss of vestibular function (vestibular rating scores were 16 at day 3; 12 at day 7; and 2 at day 21). Note the extensive loss of hair cell bundles. **F** Utricle of another mouse treated with 1.25 mmol/kg of allylnitrile displaying a significant loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 13). Less than half of the hair cell bundles remain in the epithelium. **G, H** Crista and utricle from the same mouse treated with 1.5 mmol/kg of allylnitrile, showing high vestibular rating scores (17 at day 21) and almost complete loss of hair cell bundles. Scale bars= 50 μ m in **A, C, E**, and **G**; 30 μ m in **B, D, F**, and **H**.

of vestibular dysfunction. The relationship between behavioral scores at day 21 and hair bundle counts is shown in Figure 8.

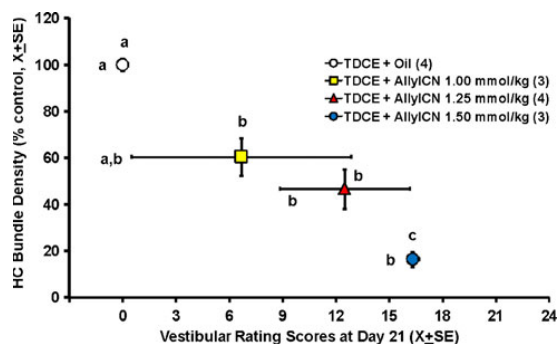


FIG. 8. Effects of allylnitrile (0, 1.0, 1.25, and 1.50 mmol/kg) on vestibular function and vestibular morphology in male Swiss mice co-treated with *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE). Relationship between behavioral rating scores at day 21 and hair cell counts in the utricle. a–c Groups not sharing a letter are significantly different, $P < 0.05$, by Duncan's test, for histological (above the symbol) and behavioral (on the left of the symbol) data.

Effects of allylnitrile and TDCE on male and female 129S1 mice

The effects of allylnitrile and TDCE co-administration were evaluated in male 129S1 mice at the single dose of 1.0 mmol/kg of allylnitrile. In the groups of animals given allylnitrile: 3 out of 15 died with no TDCE co-treatment, while zero out of nine died with TDCE co-treatment. No significant differences in body weight among treatment groups were recorded in this experiment. Allylnitrile caused an increase in scores of vestibular dysfunction, which was similar in mice co-treated with TDCE and those that were not. Analysis of the test battery data indicated significant effects of day, $F_{(3, 29)} = 18.7$, $P = 0.000$; day by treatment, $F_{(9, 71)} = 5.0$, $P = 0.000$; and treatment, $F_{(3, 31)} = 13.3$, $P = 0.000$. Significant group differences were detected at all the post-dosing experimental times, all $F_{(3, 31)} > 10.7$, $P_s = 0.000$. At all times, statistically significant differences were present between the two groups of animals treated and the two groups not treated with allylnitrile, but in no case was a difference recorded between oil (control) co-treated and TDCE co-treated animals (Duncan's test, $P < 0.05$). In this experiment, all the animals in the four experimental groups were evaluated for hair cell loss by SEM. These observations demonstrated that TDCE does not cause hair cell loss and does not modify the hair cell loss caused by 1.0 mmol/kg of allylnitrile (Fig. 9). Hair cell counts showed a similar mean 60 % reduction after allylnitrile in the animals co-treated with oil or TDCE. Thus, the group differences revealed by a significant ANOVA, $F_{(3, 26)} = 12.2$, $P = 0.000$, resulted from the allylnitrile effect, with similar hair cell bundle counts in oil and TDCE groups (Duncan's test, $P > 0.05$). The relationship between behavioral

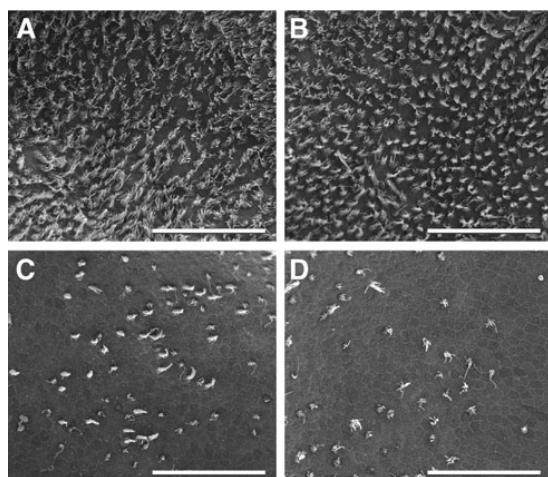


FIG. 9. Effects of *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE) and allylnitrile (1.0 mmol/kg) on the vestibular sensory epithelia of male 129S1 mice as observed by SEM 4–5 weeks after exposure. **A** Control. Utricle of a mouse treated with control vehicles; vestibular rating score at day 21 was 0. **B** Control-like appearance of a utricle from a mouse exposed to TDCE but not to allylnitrile and displaying no evidence of vestibular dysfunction (vestibular rating score at day 21 was 0). **C** Utricle of a mouse treated with 1.0 mmol/kg of allylnitrile, without TDCE co-treatment, and displaying significant loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 22). **D** Utricle of a mouse co-treated with TDCE and 1.0 mmol/kg of allylnitrile and suffering significant loss of vestibular function (vestibular rating score at day 21 was 21). Note the similarity of the sensory epithelia after exposure (**B, D**) or not (**A, C**) to TDCE. Scale bars=50 μ m.

scores at day 21 and SEM counts is shown in Figure 10.

Female 129S1 mice administered 1.5 mmol/kg of allylnitrile and not co-treated with TDCE displayed a high level of mortality (11/15) which was only marginally attenuated (5/11) by TDCE co-treatment ($\chi^2_{(1)}=2.798$,

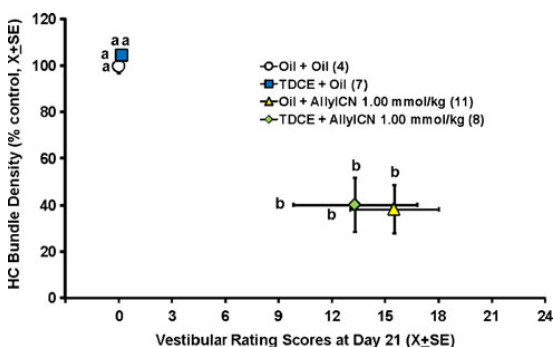


FIG. 10. Effects of allylnitrile (0 and 1.0 mmol/kg) on vestibular function and vestibular morphology in male 129S1 mice co-treated or not with *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE). Relationship between behavioral rating scores at day 21 and hair cell counts in the utricle. *a, b* Groups not sharing a letter are significantly different, $P < 0.05$, by Duncan's test, for histological (above the symbol) and behavioral (on the left of the symbol) data.

$P=0.094$). In this experiment, no significant protective effect of TDCE on the effect of the nitrile on body weight was observed; maximal loss was recorded for both allylnitrile groups at day 3 after dosing and was 18 % in the animals co-treated with oil (control) and 15 % in the animals co-treated with TDCE. Allylnitrile caused a similar increase in scores of vestibular dysfunction, in mice co-treated with TDCE and those that were not. Analysis of the test battery data indicated significant effects of day, $F_{(3, 15)}=1485$, $P=0.000$; day by treatment, $F_{(9, 37)}=43.8$, $P=0.000$; and treatment, $F_{(3, 17)}=518$, $P=0.000$. Significant group differences were detected at all the post-dosing experimental times, all $F_{(3, 17)} > 540$, $P_s=0.000$. At all times, statistically significant differences were present between the two groups of animals treated and the two groups not treated with allylnitrile, but in no case was a difference recorded between oil co-treated and TDCE co-treated animals (Duncan's test, $P < 0.05$). When all animals in the experiment were examined by SEM for loss of hair cells, the data obtained demonstrated that TDCE does not cause hair cell loss and does not modify the hair cell loss caused by 1.5 mmol/kg of allylnitrile. Thus, the group differences revealed by a significant ANOVA, $F_{(3, 17)}=58.8$, $P=0.000$, resulted from the allylnitrile effect, with similar hair cell bundle counts in oil and TDCE groups (Duncan's test, $P > 0.05$). The relationship between behavioral scores at day 21 and SEM counts is shown in Figure 11.

DISCUSSION

A dependable model for vestibular hair cell degeneration in rodents, and mice in particular, is a long-

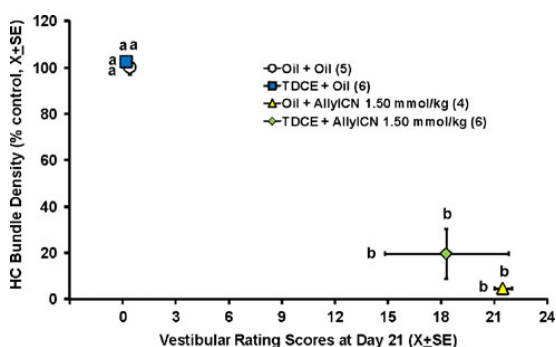


FIG. 11. Effects of allylnitrile (0 and 1.5 mmol/kg) on vestibular function and vestibular morphology in female 129S1 mice co-treated or not with *trans*-1,2-dichloroethylene (TDCE). Relationship between behavioral rating scores at day 21 and hair cell counts in the utricle. *a, b* Groups not sharing a letter are significantly different, $P < 0.05$, by Duncan's test, for histological (above the symbol) and behavioral (on the left of the symbol) data.

standing need in inner ear research, for example, in studies to develop strategies for alleviating human labyrinth damage by hair cell protection, regeneration, or replacement. One possible model is exposure to the nitriles allylnitrile and *cis*-crotononitrile, with a known ototoxic potential (Balbuena and Llorens 2001, 2003; Gagnaire et al. 2001; Soler-Martín et al. 2007; Boadas-Vaello et al. 2007, 2009; Saldaña-Ruiz et al. 2012a). In this study, we have evaluated refining these models through the use of pharmacological agents that inhibit the CYP2E1 enzyme to reduce the acute systemic toxicity of the nitriles. The data obtained show that co-treatment with TDCE and a single dose of allylnitrile (1.0 or 1.25 mmol/kg) in male Swiss or 129S1 mice results in extensive hair cell loss with little or no associated mortality. Other data indicate that female mice, the alternative ototoxic nitrile *cis*-crotononitrile, and the alternative CYP2E1 inhibitor DAS can also be used. Using these models, we assessed the relationship between the extent of utricular damage and the vestibular rating scores from a test battery designed to evaluate vestibular dysfunction; the data show that the behavioral scores are predictive of the extent of the pathology and can thus be used to select animals with extensive loss of hair cells.

We initially carried out two separate dose–response experiments, with one of two different strains, sexes, nitriles, and CYP2E1 inhibitors in each, as an initial evaluation of the general usefulness of the strategy, and a starting point for selecting model parameters. The two strains used were selected for their relevance: the 129S1 strain was developed by Jackson as an adequate control of many genetically modified strains constructed on a 129/SV genetic background, while the Swiss strain is one of the most widely used. We used *cis*-crotononitrile with 129S1 females (Boadas-Vaello et al. 2007) and allylnitrile with Swiss males (Boadas-Vaello et al. 2009), on the basis of the results of our previous studies.

Female 129S1 mice co-treated with DAS showed less acute toxicity and similar vestibular toxicity from *cis*-crotononitrile as mice that were not co-treated. However, the protection was only partial and similar mortality rates were observed at the high *cis*-crotononitrile dose, which indicates a modest rightward shift in the acute toxicity dose–response relationship. Thus, the *cis*-crotononitrile+DAS experiment corroborated the hypothesis that CYP2E1 inhibitors afford protection against nitrile toxicity, but offered a modest improvement in the usefulness of *cis*-crotononitrile as a model for vestibular hair cell ablation in the female 129S1 mouse. In this experiment, only behavioral data were available to demonstrate that DAS causes no vestibular toxicity and does not modify the vestibular toxicity of *cis*-crotononitrile, while both behavioral and

SEM data demonstrated the dose-dependent vestibular toxicity of the nitrile in mice co-treated with DAS. A similar set of data were available for the other dose–response experiment. In this second experiment, TDCE was found to significantly protect male Swiss mice against the acute toxicity of allylnitrile, with only one death and modest body weight effects being observed in the high-dose groups, which had high scores of vestibular dysfunction and extensive to almost complete loss of hair cells. TDCE has a low toxicity, with an acute oral mouse LD₅₀>2,000 mg/kg (Barnes et al. 1985), and no apparent effect was observed with the 3×100 mg/kg dose regime used in the present study. In comparing the nitriles, allylnitrile has a lower LD₅₀ than *cis*-crotononitrile, and the latter apparently results in a more gradual dose–response relationship for vestibular toxicity. However, the lethality data indicate better protection by TDCE against allylnitrile toxicity than DAS against *cis*-crotononitrile toxicity. In addition, allylnitrile is directly available from commercial sources while crotonitrile is only available as a racemic mixture that needs to be distilled (Balbuena and Llorens 2003). For these reasons, we decided to focus on TDCE+allylnitrile for further assessment.

Behavioral and histological data from an initial single-dose experiment using TDCE and 1 mmol/kg of allylnitrile demonstrated the effectiveness of the nitrile in males of the 129S1 strain, the absence of mortality after TDCE co-treatment, the absence of TDCE vestibular toxicity in animals not exposed to allylnitrile, and the absence of any effect of TDCE on the vestibular toxicity of the nitrile. A second single-dose experiment demonstrated the effectiveness of allylnitrile in female 129S1 mice. Again, TDCE caused no vestibular toxicity in animals not exposed to allylnitrile and did not significantly modify the vestibular toxicity of the nitrile. Animals in the previous experiment had not displayed maximal behavioral dysfunction or hair cell loss, and data in male Swiss mice (Fig. 5) suggested that TDCE could protect against the lethal effects of up to 1.5 mmol/kg of allylnitrile; this dose was therefore used in this experiment. However, TDCE offered only marginally significant protection at this high dose of allylnitrile, and an unacceptable level of mortality was recorded in both non-TDCE and TDCE groups of animals.

In the dose–response experiments, intermediate vestibular rating scores (i.e., 5 to 12) were infrequent, as was the observation of moderate loss of utricular hair bundles, as shown in Figure 3D. Intermediate mean values were obtained in association with high variability and reflected mean values from highly affected and largely unaffected animals. Thus, for example, among the male 129S1 mice treated with TDCE+1.0 mmol/kg of allylnitrile, three animals showed bundle counts >65 % of control mean in

association with control-like behavior (rating scores <3), and five showed extensive epithelial damage (<35 % of control mean) in association with high scores (>17) of vestibular dysfunction. The occurrence of partial damage and intermediate vestibular rating scores is nevertheless possible, as observed in a few animals from different treatment groups. From our previous experience with rats (Llorens et al. 1993), mice, and guinea pigs (Soler-Martín et al. 2007), a more gradual dose–response relationship characterizes the vestibular toxicity of IDPN. This is also related with the time lapse between nitrile administration and the appearance of vestibular dysfunction, which is much longer for IDPN than for allylnitrile and *cis*-crotononitrile. These observations suggest that the pharmacokinetic properties of the ototoxic nitrile are key determinants of the steepness of the dose–response curve, which is maximal for allylnitrile. This nitrile will thus show limited suitability for studies requiring loss of a small to moderate percentage of hair cells (e.g., 20 to 60 %), but is much more appropriate for attaining extensive (e.g., 60 to 100 %) hair cell loss. Importantly, the presence of such extensive damage can be reliably predicted by behavioral assessment, and a threshold in behavioral scores (e.g., >14) may be set to select animals with such (>60 %) loss. Considering the data from all four experiments, the individual data show that the 35 animals with scores >14 had bundle counts ≤40 % of the corresponding control mean, except for one animal that had a value of 45 %. On a cautionary note, the discriminatory power of the test battery among severely affected animals appeared limited, as similar ratings were obtained for animals with estimated 70 to 100 % loss of hair cells in the utricle.

Previous models for ototoxic cochlear lesioning showed undamaged vestibular epithelia (Taylor et al. 2008; Oesterle et al. 2008). In the present study, we did not assess the effect of *cis*-crotononitrile and allylnitrile on the auditory system. However, in the rat, both nitriles have been demonstrated to cause hearing loss and cochlear hair cell degeneration (Gagnaire et al. 2001; Balbuena and Llorens 2001, 2003), with similar dose–response relationships between cochlear and vestibular damage. Further studies are required to assess whether the present exposure models result in useful cochlear damage in addition to the assessed vestibular damage.

In conclusion, we evaluated a methodological refinement for the use of ototoxic nitriles as tools to cause hair cell ablation in adult mice. Systemic exposure to an ototoxic nitrile, allylnitrile or *cis*-crotononitrile, was assayed with co-administration of pharmacological agents that diminish the acute toxicity of these nitriles without reducing their vestibular toxicity. The protection afforded was limit-

ed, but significant at submaximal doses of the nitriles. These exposure models allowed the study of the relationship between scores in a behavioral test battery for vestibular dysfunction and loss of hair cells as assessed by SEM. The data obtained indicate that high vestibular rating scores in the behavioral test battery predict extensive to complete loss of hair cells in the utricles. This provides a means of selecting animals for subsequent studies of vestibular hair cell regeneration or replacement.

Note

After submission of this manuscript, Golub et al. (2012) have published a transgenic mouse model for targeted ablation of the adult utricle with diphtheria toxin. While the model proposed by Golub et al. has obvious value, the use of nitriles as described in the present paper has the advantage that it does not require adoption and maintenance of a particular mouse strain, so it can be readily adapted to a much wider range of laboratory settings.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the student Xavier Farré for his assistance in some of the experiments, and Angel Messeguer (CSIC, Barcelona, Spain) for helping with the distillation of the *cis*-crotononitrile isomer. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant numbers BFU2009-06945 and BFU2012-31364) and the Generalitat of Catalonia (grant number 2009 SGR 1059). The SEM studies were performed at the Science and Technology Centers of the University of Barcelona.

REFERENCES

- BALBUENA E, LLORENS J (2001) Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res* 904:298–306
- BALBUENA E, LLORENS J (2003) Comparison of *cis*- and *trans*-crotononitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicol Appl Pharmacol* 187:89–100
- BARNES DW, SANDERS VM, WHITE KL JR, SHOPP GM JR, MUNSON AE (1985) Toxicology of *trans*-1,2-dichloroethylene in the mouse. *Drug Chem Toxicol* 8:373–392
- BOADAS-VAELLO P, RIERA J, LLORENS J (2005) Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol Sci* 88:456–466
- BOADAS-VAELLO P, JOVER E, DIEZ-PADRISA N, BAYONA JM, LLORENS J (2007) Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of *cis*-crotononitrile in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 225:310–317
- BOADAS-VAELLO P, JOVER E, SALDAÑA-RUIZ S, SOLER-MARTÍN C, CHABBERT C, BAYONA JM, LLORENS J (2009) Allylnitrile metabolism by

- CYP2E1 and other CYPs leads to distinct lethal and vestibulotoxic effects in the mouse. *Toxicol Sci* 107:461–472
- BRADY JF, ISHIZAKI H, FUKUTO JM, LIN MC, FADEL A, GAPAC JM, YANG CS (1991) Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol* 4:642–647
- BRUGEAUD A, TRAVO C, DEMÉMES D, LENOIR M, LLORENS J, PUEL J-L, CHABBERT C (2007) Control of hair cell excitability by vestibular primary sensory neurons. *J Neurosci* 27:3503–3511
- BRUECKNER JK, ASHBY LP, PRICHARD JR, PORTER JD (1999) Vestibulo-ocular pathways modulate extraocular muscle myosin expression patterns. *Cell Tissue Res* 295:477–484
- CHANAS B, WANG H, GHANAYEM BI (2003) Differential metabolism of acrylonitrile to cyanide is responsible for the greater sensitivity of male vs female mice: role of CYP2E1 and epoxide hydrolases. *Toxicol Appl Pharmacol* 193:293–302
- CHOU SM, HARTMANN HA (1964) Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. With a concept—“axostasis”. *Acta Neuropathol* 3:428–450
- CROFTON KM, JANSSEN R, PRAZMA J, PULVER S, JR BARONE S (1994) The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hear Res* 80:129–140
- CSILLAG A (2005) Atlas of the sensory organs. *Humana, Totowa*
- FORGE A, SCHACHT J (2000) Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol* 5:3–22
- GAGNAIRE F, MARIGNAC B, BAN M, LANGLAIS C (2001) The ototoxic effects induced in rats by treatment for 12 weeks with 2-butenenitrile, 3-butenenitrile and cis-2-pentenitrile. *Pharmacol Toxicol* 88:126–134
- GOLUB JS, TONG L, NGUYEN TB, HUME CR, PALMITER RD, RUBEL EW, STONE JS (2012) Hair cell replacement in adult mouse utricles after targeted ablation of hair cells with diphteria toxin. *J Neurosci* 32:15093–15105
- GRIFFIN JW, HOFFMAN PN, CLARK AW, CARROLL PT, PRICE DL (1978) Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment of beta₂-iminodipropionitrile administration. *Science* 202:633–635
- HEYDT JL, CUNNINGHAM LL, RUBEL EW, COLTRERA MD (2004) Round window gentamicin application: an inner ear hair cell damage protocol for the mouse. *Hear Res* 192:65–74
- ISHIBASHI T, TAKUMIDA M, AKAGI N, HIRAKAWA K, ANNIKO M (2009) Changes in transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3 and 4 expression in mouse inner ear following gentamicin challenge. *Acta Otolaryngol* 129:116–126
- KHAN Z, CAREY J, PARK HJ, LEHAR M, LASKER D, JINNAH HA (2004) Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant. *Neuroscience* 127:785–796
- LILLY PD, THORNTON-MANNING JR, GARGAS ML, CLEWELL HJ, ANDERSEN ME (1998) Kinetic characterization of CYP2E1 inhibition *in vivo* and *in vitro* by the chloroethylenes. *Arch Toxicol* 72:609–621
- LLORENS J, DEMÉMES D (1996) 3,3'-Iminodipropionitrile induces neurofilament accumulations in the perikarya of rat vestibular ganglion neurons. *Brain Res* 717:118–126
- LLORENS J, DEMÉMES D, SANS A (1993) The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 123:199–210
- LLORENS J, DEMÉMES D (1994) Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia. *Hear Res* 76:78–86
- LLORENS J, RODRÍGUEZ-FARRÉ E (1997) Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 19:117–127
- LLORENS J, AGUILÓ A, RODRÍGUEZ-FARRÉ E (1998) Behavioral disturbances and vestibular pathology following crotonitrile exposure in rats. *J Periph Nerv Sys* 3:189–196
- MATHEWS JM, ETHERIDGE AS, RAYMER JH, BLACK SR, PULLIAM DW JR, BUGHER JR (1998) Selective inhibition of cytochrome P450 2E1 *in vivo* and *in vitro* with trans-1,2-dichloroethylene. *Chem Res Toxicol* 11:778–785
- MURILLO-CUESTA S, CONTRERAS J, CEDIEL R, VARELA-NIETO I (2009) Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Lab Anim* 44:124–131
- OESTERLE EC, CAMPBELL S, TAYLOR RR, FORGE A, HUME CR (2008) Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 9:65–89
- SALDAÑA-RUIZ S, SOLER-MARTÍN C, LLORENS J (2012A) Role of CYP2E1-mediated metabolism in the acute and vestibular toxicities of nineteen nitriles in the mouse. *Toxicol Lett* 208:125–132
- SALDAÑA-RUIZ S, HERNÁNDEZ-MIR G, SEDÓ-CABEZÓN L, CUTILLAS B, LLORENS J (2012B) Vestibular toxicity of cis-2-pentenitrile in the rat. *Toxicol Lett* 211:281–288
- SCHLECKER C, PRAETORIUS M, BROUGH DE, PRESLER RG JR, HSU C, PLINKERT PK, STAECKER H (2011) Selective atonal gene delivery improves balance function in a mouse model of vestibular disease. *Gene Ther* 18:884–890
- SEOANE A, DEMÉMES D, LLORENS J (2001A) Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *J Comp Neurol* 439:385–399
- SEOANE A, DEMÉMES D, LLORENS J (2001B) Pathology of the rat vestibular sensory epithelia during subchronic 3,3'-iminodipropionitrile exposure: hair cells may not be the primary target of toxicity. *Acta Neuropathol* 102:339–348
- SOLER-MARTÍN C, DIEZ-PADRISA N, BOADAS-VAELLO P, LLORENS J (2007) Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol Sci* 96:123–132
- SOLER-MARTÍN C, BOADAS-VAELLO P, SALDAÑA-RUIZ S, CUTILLAS B, LLORENS J (2011) Butenenitriles have low axonopathic potential in the rat. *Toxicol Lett* 200:187–193
- TAYLOR RR, NEVILL G, FORGE A (2008) Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions. *J Assoc Res Otolaryngol* 9:44–64

Vestibulotoxic Properties of Potential Metabolites of Allylnitrile

Federico Rúa,* Mélo die Buffard,†‡ Lara Sedó-Cabezón,† Gerard Hernández-Mir,† Aurélien de la Torre,*‡
Sandra Saldaña-Ruíz,†§ Christian Chabbert,¶ Josep M. Bayona,|| Angel Messeguer,* and Jordi Llorens†§¹

*Departament de Nanotecnologia Química i Biomolecular, Institut de Química Avançada de Catalunya—CSIC, 08034 Barcelona, Catalunya, Spain; †Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain; ‡École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 34296 Montpellier, France; §Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain; ¶Institut des Neurosciences de Montpellier, INSERM U1051, 34090 Montpellier, France; and ||Departament de Química Ambiental, Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua—CSIC, 08034 Barcelona, Catalunya, Spain

¹To whom correspondence should be addressed at Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain. Fax: (+34) 934024268. E-mail: jllorens@ub.edu.

Received April 26, 2013; accepted May 31, 2013

This study addressed the hypothesis that epoxidation of the double bond in allylnitrile mediates its vestibular toxicity, directly or after subsequent metabolism by epoxide hydrolases. The potential metabolites 3,4-epoxybutyronitrile and 3,4-dihydroxybutyronitrile were synthesized and characterized. In aqueous solutions containing sodium or potassium ions, 3,4-epoxybutyronitrile rearranged to 4-hydroxybut-2-enitrile, and this compound was also isolated for study. Male adult Long-Evans rats were exposed to allylnitrile or 3,4-epoxybutyronitrile by bilateral transtympanic injection, and vestibular toxicity was assessed using a behavioral test battery and scanning electron microscopy (SEM) observation of the sensory epithelia. Overt vestibular toxicity was caused by 3,4-epoxybutyronitrile at 0.125 mmol/ear and by allylnitrile in some animals at 0.25 mmol/ear. Additional rats were exposed by unilateral transtympanic injection. In these studies, behavioral evidences and SEM observations demonstrated unilateral vestibular toxicity after 0.125 mmol of 3,4-epoxybutyronitrile and bilateral vestibular toxicity after 0.50 mmol of allylnitrile. However, 0.25 mmol of allylnitrile did not cause vestibular toxicity. Unilateral administration of 0.50 mmol of 3,4-dihydroxybutyronitrile or 4-hydroxybut-2-enitrile caused no vestibular toxicity. The four compounds were also evaluated in the mouse utricle explant culture model. In 8-h exposure experiments, hair cells completely disappeared after 3,4-epoxybutyronitrile at concentrations of 325 or 450 μM but not at concentrations of 150 μM or lower. In contrast, no difference from controls was recorded in utricles exposed to 450 μM or 1.5 mM of allylnitrile, 3,4-dihydroxybutyronitrile, or 4-hydroxybut-2-enitrile. Taken together, the present data support the hypothesis that 3,4-epoxybutyronitrile is the active metabolite of allylnitrile for vestibular toxicity.

Key Words: ototoxicity; vestibular toxicity; nitrile; xenobiotic metabolism; 3,4-epoxybutyronitrile; hair cell.

Nitriles are compounds containing cyano (R-CN) groups. They have wide industrial use as solvents and chemical

intermediates in the synthesis of plastics, nylons, and elastomers (DeVito, 2007). Many nitriles occur also as natural compounds (Jones, 1998). The four-carbon allylnitrile (CAS no.: 109-75-1) occurs as an industrial product and also as a natural compound (Tanii *et al.*, 2004). Major toxic effects of nitriles are acute lethality, osteolathyrism, and neurotoxicity, including sensory toxicity (Crofton and Knight, 1991; DeVito, 1996; Genter *et al.*, 1992; Llorens *et al.*, 1993, 2011; Selye, 1957; Seoane *et al.*, 1999). In several species, including mammalian and nonmammalian, the vestibular system has been reported to be a major target for 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), allylnitrile, *cis*-crotonitrile, and *cis*-2-pentenitrile. These nitriles cause degeneration of the vestibular sensory hair cells (HCs) and the resulting deficit in vestibular function is recognized by a permanent alteration in the motor behavior of the animals (Balbuena and Llorens, 2001, 2003; Boadas-Vaello *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Saldaña-Ruíz *et al.*, 2012a,b; Soler-Martín *et al.*, 2007). Another vestibulotoxic nitrile in the mouse is *trans*-crotonitrile (Saldaña-Ruíz *et al.*, 2012b), although in the rat this nitrile causes neuronal degeneration in discrete brain areas rather than vestibular toxicity (Boadas-Vaello *et al.*, 2005; Seoane *et al.*, 2005).

For several of the vestibulotoxic nitriles, there is evidence that metabolic bioactivation is required for vestibular toxicity (Boadas-Vaello *et al.*, 2009; Saldaña-Ruíz *et al.*, 2012a). In the case of IDPN, a hypothesis on metabolic bioactivation has received considerable attention and indirect support (Denlinger *et al.*, 1992, 1994; Jacobson *et al.*, 1987; Morandi *et al.*, 1987; Nace *et al.*, 1997), but no direct evidence has been obtained, and conflicting results are also available (Llorens and Crofton, 1991). So far, the active metabolite(s) and pathways involved in vestibular toxicity have not been identified for any nitrile. In recent years, we have used

CYP2E1-null mice to evaluate the hypothesis that CYP2E1-mediated metabolism is responsible for the bioactivation. Available data demonstrate that many low-molecular-weight nitriles are CYP2E1 substrates, but that in no case is CYP2E1-mediated metabolism associated with vestibular toxicity. Instead, this enzyme appears to frequently be responsible for cyanide release and acute mortality, probably through α -carbon hydroxylation (Boadas-Vaello *et al.*, 2007, 2009; Saldaña-Ruíz *et al.*, 2012b). In the case of allylnitrile, the data obtained led us to hypothesize that epoxidation of the β - γ double bond, perhaps by CYP2A5, mediates vestibular toxicity either directly or after subsequent opening of the epoxide by epoxide hydrolase activities (Fig. 1) (Boadas-Vaello *et al.*, 2009). To address this hypothesis, we have now synthesized the hypothesized allylnitrile metabolites and evaluated their vestibular toxicity *in vivo* and *in vitro* in comparison with that of allylnitrile. These included initially 3,4-epoxybutyronitrile (CAS no.: 624-58-8; oxiran-2-ylacetonitrile) and 3,4-dihydroxybutyronitrile (CAS no.: 83527-35-9; 3,4-dihydroxybutanenitrile). A third allylnitrile derivative, 4-hydroxybut-2-enitrile (CAS no.: 10479-81-9; (2*E*)-4-hydroxybut-2-enitrile), was identified as a spontaneous rearrangement product of 3,4-epoxybutyronitrile in aqueous solutions containing alkaline ions. This compound was also isolated and evaluated. The data obtained demonstrate a direct toxic effect of 3,4-epoxybutyronitrile on the vestibular sensory epithelia.

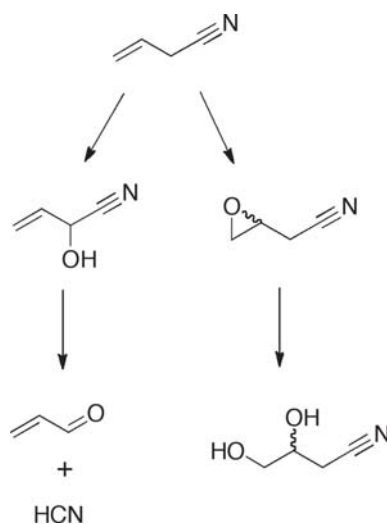


FIG. 1. Hypothesized pathways for the CYP-mediated oxidative metabolism of allylnitrile. Hydroxylation at the α carbon would generate an unstable cyanohydrin, which would subsequently decompose into 2-propenal (acrolein) and cyanide. The alternate pathway includes the epoxidation of the β - γ double bond. The 3,4-epoxybutyronitrile that is formed may be further metabolized to 3,4-dihydroxybutyronitrile by epoxide hydrolase activity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Allylnitrile (> 98%) was purchased from Merck-Schuchard (Hohenbrunn bei München, Germany). Potassium fluoride, meta-chloroperbenzoic acid, glycidol, LiClO_4 , glutaraldehyde solution (25%), glucose, and penicillin G were from Sigma-Aldrich Química S.A. (Tres Cantos, Spain), and dichloromethane and acetonitrile from Panreac Química (Castellar del Vallès, Spain). The Mowiol 4-88 Reagent was from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) without L-glutamine, L15 (Leibovitz) medium, N2 supplement, GlutaMAX, and 1M HEPES buffer were from Life Technologies (Barcelona, Spain). Mouse monoclonal anti-calmodulin (clone 6D4) was obtained from Sigma, and rabbit polyclonal anti-myosin VIIa from Proteus Biosciences (Alcobendas, Spain). Alexa-fluor-555-conjugated phalloidin, Alexa-fluor-647 donkey anti-mouse IgG, and Alexa-fluor-488 donkey anti-rabbit IgG were obtained from Molecular Probes (Invitrogen S.A., Prat del Llobregat, Spain).

Synthesis of Allylnitrile Derivatives

Analytical methods. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in CDCl_3 on a Varian Unity 300 MHz machine and a Varian Inova 500 apparatus ($^1\text{H-NMR}$, 500 MHz; $^{13}\text{C-NMR}$, 125 MHz). Chemical shifts are given in ppm (δ) relative to the CDCl_3 signal (7.24 ppm for $^1\text{H-NMR}$ and 77.23 ppm for $^{13}\text{C-NMR}$), and coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). Multiplicities are reported using the following abbreviations: d, doublet; t, triplet; and m, multiplet. Gas chromatography analyses were carried out on a Carlo Erba MFC 500 chromatograph coupled to a Fisons NPD 800 detector with a GasPRO column (60 m \times 0.32 mm internal diameter) or a J&W DB-WAX column (30 m \times 0.32 mm).

3,4-Epoxybutyronitrile. It was obtained following the procedure described by Fleming *et al.* (2001) with minor modifications. *m*-Chloroperoxybenzoic acid (20 g, 0.75 eq. each day) was added to a solution of allylnitrile (12 ml, 1 eq.) in dichloromethane (300 ml) for 3 days. The reaction mixture was stirred at room temperature for five more days (Fig. 2A). Then, the organic acids were eliminated by stirring the crude reaction mixture with an excess of KF (13 g, 2 eq.) for 2 h at room temperature, followed by filtration of the insoluble material (Camps *et al.*, 1981). The filtrate was carefully concentrated and purified by vacuum distillation to give 8.0 g of the desired epoxide (62°C at 5 mbar) in 64% yield. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): (Supplementary fig. 1A) 2.75 (d, $J = 4.6$, 2H); 2.89 (t, $J = 4.2$, 2H); 3.22 (dt, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 8.1$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$: 20.06; 45.43; 46.53; 115.96.

3,4-Dihydroxybutyronitrile. To obtain 3,4-dihydroxybutyronitrile (Jung and Shaw, 1980), NaCN (1.32 g, 1.5 eq.) and LiClO_4 (0.97 g, 0.5 eq.) were added to a solution of glycidol (1.2 ml, 1 eq.) in CH_3CN (21 ml), and the mixture was stirred for 3 h at 55°C (Fig. 2B) (Arnone *et al.*, 1995), diluted with a NaCl saturated solution (0.325 ml, 1 eq.) and an excess of *tert*-butyl methyl ether (20 ml), and filtered over Celite (R). The residue obtained from solvent elimination contained the expected 3,4-dihydroxybutyronitrile (as a *R,S* stereoisomer mixture) in 94% yield (1.70 g). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (Supplementary fig. 1B) 2.75 (d, $J = 4.6$, 2H); 2.89 (t, $J = 4.2$, 2H); 3.22 (dt, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 8.1$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$: 20.06; 45.43; 46.53; 115.96.

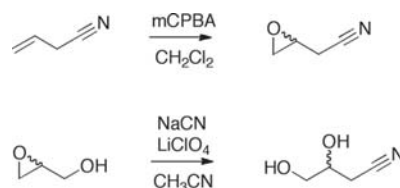


FIG. 2. Synthesis of allylnitrile metabolites: (A) 3,4-epoxybutyronitrile; (B) 3,4-dihydroxybutyronitrile.

4-Hydroxybut-2-enenitrile. To obtain 4-hydroxybut-2-enenitrile (Nudelman and Keinan, 1982), a solution of 3,4-epoxybutyronitrile (1 ml, 1 eq.) in PBS (5 ml) was stirred for 4 h at room temperature (Fig. 3). The crude reaction mixture was extracted with ethyl acetate, and the collected organic fractions were dried over Na_2SO_4 and concentrated to give 0.89 g of the desired compound (89% yield). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): (Supplementary fig. 1C): 4.37 (m, 2H); 5.74 (dt, $J_1 = 2.2$, $J_2 = 16.2$, 2H); 6.83 (dt, $J_1 = 3.4$, $J_2 = 16.2$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$: 60.60; 97.03; 117.2; 134.9; 155.2.

Animals

The care and use of animals were in accordance with Acts 5/1995 and 214/1997 of the Regional Government of Catalonia and approved by the University of Barcelona's Ethics Committee on Animal Experiments. Eighty-nine-week-old male Long-Evans rats (CERJ, Le-Genest-Saint-Isle, France) were used for *in vivo* studies. They were housed two to four per cage in standard Macrolon cages (280×520×145 mm) with wood shavings as bedding. They were acclimatized for at least 7 days before experimentation. For *in vitro* studies, 3- to 6-month-old male and female 129S1/SvImJ mice were used. They were obtained from a local colony established by breeding pairs obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). After weaning, mice were housed two to six per cage in standard Macrolon cages (28×28×15 cm) with wood shavings as bedding. Rats and mice were maintained on a 12:12 L:D cycle (0700:1900 h) at $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ and given standard diet pellets (TEKLAD 2014, Harlan Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) *ad libitum*.

Dosing

Animals were dosed by transtympanic injection as described below. For complete behavioral assessment, we used bilateral administration of control vehicle (50 μl propylene glycol, $n = 4$) or nitrile solutions as follows: 3,4-epoxybutyronitrile was dosed at 0.0312 mmol/ear ($n = 2$), 0.0625 mmol/ear ($n = 2$), 0.125 mmol/ear ($n = 3$), and 0.250 mmol/ear ($n = 3$). Allylnitrile was dosed at 0.125 mmol/ear ($n = 5$) and 0.250 mmol/ear ($n = 4$). Other animals were administered 3,4-epoxybutyronitrile (0.125 mmol, $n = 5$), allylnitrile (0.25 mmol, $n = 5$; 0.50 mmol, $n = 4$), 4-hydroxybut-2-enenitrile (0.50 mmol, $n = 4$), and 3,4-dihydroxybutyronitrile (0.50 mmol, $n = 3$) on one side only.

Transtympanic Exposure

The inner ear can be exposed to chemical agents via diffusion from the middle ear after transtympanic injection (Parnes *et al.*, 1999). This is a route that is increasingly used for therapeutic drug delivery in humans suffering auditory and vestibular diseases (Leary Swam *et al.*, 2008). In laboratory animals, transtympanic exposure is a well-established model for ototoxicity studies (Horn *et al.*, 1981; Janning *et al.*, 1998; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Sera *et al.*, 1987).

Rats were anesthetized with isoflurane using a standard vaporizer for small animals (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, Spain), and they were also

administered a dose of analgesia (buprenorphine, 0.05 mg/kg, sc). The animals were then placed on their side and, using a surgical microscope, the tympanic membrane was punctured with a 29 G needle to administer 50 μl of nitrile solution into the middle-ear cavity. In the case of bilateral exposure, the animals were maintained under anesthesia on their side for 10 min before turning them for administration into the second ear. Once the intratympanic administrations had been completed, the animals were given a dose of meloxicam (0.5 mg/kg, sc) and observed for complete recovery from the isoflurane anesthesia. A second dose of the meloxicam analgesia was administered 24 h later.

Behavioral Analysis

Disturbance of vestibular function was determined using a battery of behavioral tests well suited to evaluate the bilateral symmetrical loss that occurs following systemic exposure to ototoxic nitriles (Boadas-Vaello *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997). Briefly, rats were placed for 1 min in a 50×50 cm glass cube and the experimenter rated the animals from 0 to 4 for circling, retropulsion, and abnormal head movements. Circling was defined as stereotypical circling ambulation. Retropulsion consisted of backward displacement of the animal. Head bobbing consisted of intermittent extreme backward extension of the neck. The rats were then rated 0–4 for the tail-hang reflex, contact inhibition of the righting reflex, and air-righting reflex tests. When lifted by the tail, normal rats exhibit a “landing” response consisting of forelimb extension. Rats with impaired vestibular function bend ventrally, sometimes “crawling” up toward their tails, thus tending to occipital landing. For the contact inhibition of the righting reflex, rats were placed supine on a horizontal surface, and a metal bar grid was lightly placed in contact with the soles of their feet. Healthy rats quickly right themselves, whereas vestibular-deficient rats lie on their back with their feet up and “walk” on the ventral surface. For the air-righting reflex, animals were held supine and dropped from a height of 40 cm onto a foam cushion. Normal rats are successful in righting themselves in the air, whereas vestibular-deficient rats are not. A summary statistic was obtained by adding up the scores for all behavior patterns.

In addition, animals were observed for signs of asymmetry in the vestibular damage (Saxon and White, 2006; Vignaux *et al.*, 2012). Unilateral vestibular damage causes animals to tilt their heads to the side. In the tail-hang test, unilateral lesions cause body rotation around the tail axis rather than ventral bending.

Corneal Opacity

Rats were also observed for presence/absence of corneal opacity. Systemic exposure to vestibulotoxic doses of allylnitrile has been reported to cause dose-dependent opacity of the cornea (Balbuena and Llorens, 2001).

Assessment of Vestibular Sensory Epithelia From In Vivo Studies

We examined surface preparations of the vestibular sensory epithelia using scanning electron microscopy (SEM), following standard procedures as described elsewhere (Llorens *et al.*, 1993; Seoane *et al.*, 2001; Soler-Martín *et al.*, 2007). Briefly, rats were anesthetized with 400 mg/kg chloral hydrate and transcardially perfused with 50 ml heparinized saline followed by 350 ml of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). After perfusion, the sensory epithelia in the temporal bones were dissected out in the same fixative and allowed an additional 1.5 h of fixation. The samples were then postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer and subsequently stored in 70% ethanol at 4°C until further processing. The epithelia were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol up to 100%, dried in a critical point dryer using liquid CO_2 , coated with 5 nm of gold, stored in a vacuum chamber for 1–3 days, and observed in a Quanta-200 (Fei Company) 360 SEM at an accelerating voltage of 15 kV.

In Vitro Studies

Mouse utricle cultures were used to evaluate the vestibular toxicity of the allylnitrile derivatives (Cunningham, 2006; Cunningham *et al.*, 2002). Mice were anesthetized with 100 mg/kg ketamine and killed by decapitation. The

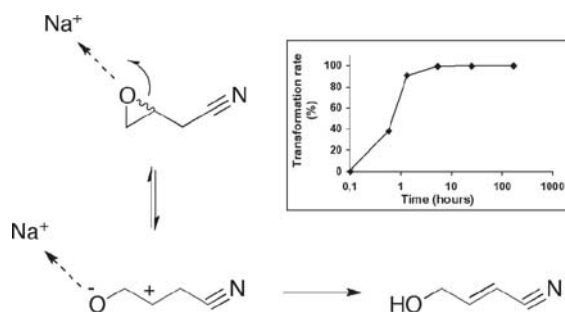


FIG. 3. Proposal of a mechanism for the 3,4-epoxybutyronitrile rearrangement into 4-hydroxybut-2-enenitrile. The inset shows the reaction course.

temporal bones were obtained and the utricles dissected out in L15 medium in a tissue culture hood equipped with a stereomicroscope. The utricles were transferred to 12-well tissue culture plates containing 2 ml of DMEM:F12 with 25mM HEPES, 1% GlutaMAX, 2% N₂, 2g/l additional glucose, and 1.5g/l penicillin G. Utricles were incubated free floating at 37°C in a 5% CO₂/95% air environment. After 48 h, the utricles were incubated in the same media containing the nitriles to be tested or the vehicle (50 µl propylene glycol). After 8 h of nitrile exposure, the utricles were transferred to clean incubation medium and allowed an overnight washout period. Culture plates included three conditions. The majority consisted of one vehicle control well and two wells exposed to two nitrile concentrations, although some experiments included nontreated controls, vehicle-exposed controls, and one nitrile treatment. One preliminary series of culture analysis explored the effects of 3,4-epoxybutyronitrile at a wide range of concentrations. Then, the toxicities of allylnitrile, 3,4-epoxybutyronitrile, 3,4-dihydroxybutyronitrile, and 4-hydroxybut-2-enenitrile were compared at 150, 325, and 450 µM. Allylnitrile, 3,4-dihydroxybutyronitrile, and 4-hydroxybut-2-enenitrile were also assessed at 1.5mM.

Assessment of Utricles From In Vitro Studies

At the end of the incubation protocol, utricles were fixed in 4% freshly depolymerized paraformaldehyde in PBS for 1 h and processed for immunofluorescence analysis following standard protocols (Lysakowski *et al.*, 2011). Briefly, utricles were rinsed with PBS and then incubated with 4% Triton-X-100, 5% donkey serum, and 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature. They were processed to simultaneously label the HCs, which express calmodulin and myosin VIIa (Cunningham *et al.*, 2002; Hasson *et al.*, 1997; Ogata and Slepceky, 1998; Sahly *et al.*, 1997), and the actin-rich tight junctions and HC stereocilia. Utricles were incubated for 48 h at 4°C in 0.3% Triton-X-100 and 5% donkey serum in PBS containing anti-calmodulin (1/150) and anti-myosin VIIa (1/600) antibodies. The specimens were then incubated overnight at 4°C with Alexa-647 donkey anti-mouse IgG (1/500) and Alexa-488 donkey anti-rabbit IgG (1/500) in 5% donkey serum and 0.3% Triton-X-100 in PBS containing Alexa-555 phalloidin (1/200) to label actin. After the final washes, the utricles were mounted in mowiol mounting medium (Osborn and Weber, 1982). The specimens were examined in a Nikon E800 fluorescence microscope and photographed with a C3 ProgRes camera (Jenoptik). For cell counts, four to six images of each utricle were obtained with the ×100 objective, and the mean numbers of cuticular plates per 6084 µm² field shown by phalloidin labeling were obtained with the help of Image J software. In some experiments, utricles from the *in vitro* experiments were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer and processed for SEM as described above for the utricles from *in vivo* experiments.

Statistics

One-way Kruskal-Wallis ANOVA was used to compare behavioral data, followed by Mann-Whitney *U*-test for two group comparisons. The α level was set at 0.05, and IBM SPSS Statistics 20 for Windows was used for statistical processing.

RESULTS

Synthesis of Potential Metabolites of Allylnitrile

Both 3,4-epoxybutyronitrile and 3,4-dihydroxybutyronitrile were synthesized as racemic mixtures. Although stereospecific synthesis of the two isomers of 3,4-dihydroxybutyronitrile was also carried out (data not shown), their biological activity was not evaluated due to the results obtained with the racemic mixture. The pure compounds were stable for months in tightly sealed vials at -20°C. However, their stability was low

if they were insufficiently purified or exposed to air at room temperature.

When dissolved in saline or PBS, 3,4-epoxybutyronitrile was observed to undergo spontaneous transformation, as revealed to the naked eye by the appearance of a yellow-brown discoloration of the initial colorless solution. The transformation product was identified as the *trans*-isomer of 4-hydroxybut-2-enenitrile ((*2E*)-4-hydroxybut-2-enenitrile) (Fleming *et al.*, 2001). The incubation of a 0.4M solution of 3,4-epoxybutyronitrile in PBS for 6 h at room temperature resulted in complete transformation into the rearranged allylic alcohol. This rearrangement was hypothesized to proceed as shown in Figure 3. In pure water or propylene glycol, 3,4-epoxybutyronitrile was found to be stable, at least for 24 h. Unlike 3,4-epoxybutyronitrile, 3,4-dihydroxybutyronitrile and 4-hydroxybut-2-enenitrile showed higher stability and no further transformations were observed on standing.

Effects of Bilateral Transtympanic Administration of Allylnitrile and 3,4-Epoxybutyronitrile

Rats given bilateral transtympanic injections of allylnitrile or 3,4-epoxybutyronitrile showed a dose-dependent loss of vestibular function (Fig. 4), similar to that observed after ip exposure (Balbuena and Llorens, 2001). Kruskal-Wallis analysis of the vehicle, 0.125 and 0.25 mmol/ear groups indicated a significant treatment effect (chi-square, 4 df = 10.1, $p = 0.039$). Major vestibular dysfunction was observed at lower doses of 3,4-epoxybutyronitrile (0.125 mmol/ear) than of allylnitrile (0.25 mmol/ear). The animals administered allylnitrile that displayed a noticeable loss of vestibular function also showed corneal opacity. In contrast, corneal opacity was not observed in the 3,4-epoxybutyronitrile animals.

At the SEM level, control animals and animals administered 3,4-epoxybutyronitrile at doses up to 0.062 mmol/ear, or allylnitrile at doses up to 0.125 mmol/ear, which caused no alterations in behavior, showed a dense presence of hair bundles from the vestibular sensory cells in the crista, utricle, and saccule sensory epithelia (Figs. 5A and 5B), with little or no difference from literature descriptions of control vestibular sensory epithelia (Llorens and Demêmes, 1994; Llorens *et al.*, 1993). Animals exposed bilaterally with high rating scores for loss of vestibular function showed bilateral marked to complete loss of hair bundles (Figs. 5C–H). In animals exposed to 0.125 mmol/ear of 3,4-epoxybutyronitrile, a complete loss of hair bundles occurred in the utricles (Fig. 5D), whereas an extensive but incomplete loss of hair bundles occurred in the crista receptors (Fig. 5C). In contrast, a complete loss of HCs was evident in the crista receptors (Fig. 5E) of the two animals exposed to 0.25 mmol/ear of allylnitrile that displayed the deepest loss of vestibular function, whereas some hair bundles were still present in the utricles (Fig. 5F). Complete loss of HCs in both crista (Fig. 5G) and utricle (Fig. 5H) receptors was recorded in the animals exposed to 0.25 mmol/ear of 3,4-epoxybutyronitrile.

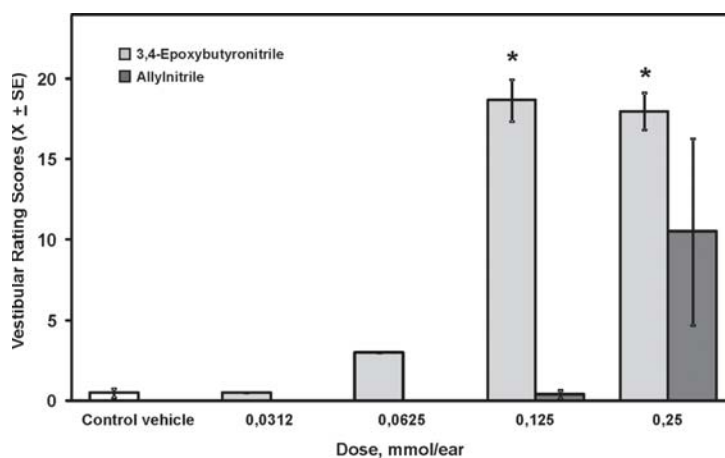


FIG. 4. Effects of 3,4-epoxybutyronitrile and of allylnitrile on vestibular function after bilateral transtympanic administration. Data are mean \pm SE rating scores for vestibular dysfunction. *: significantly different from control group, $p < 0.05$, Mann-Whitney U -test after significant Kruskal-Wallis ANOVA of the vehicle, 0.125 and 0.25 mmol/ear groups.

Effects of Unilateral Transtympanic Administration of Allylnitrile and Derivatives

Animals that received unilateral transtympanic injections of 0.125 mmol of 3,4-epoxybutyronitrile displayed behavioral evidence of unilateral vestibular damage, including head tilt and body rotation in the tail-hang test. These rats showed no corneal opacity. Histological analysis confirmed that HC loss occurred in the injected side only (Figs. 6A–D). In the injected ears, very extensive loss of HCs was observed in the crista receptors (Fig. 6A) and complete loss in the utricle receptors (Fig. 6B). The other ear of the same animals showed a control-like density of HC bundles in both the crista (Fig. 6C) and utricle (Fig. 6D) receptors.

Unilateral transtympanic administration of allylnitrile did not cause vestibular dysfunction at 0.25 mmol. After 0.50 mmol, animals showed behavioral evidence of bilateral, not unilateral, damage. For instance, ventral bending, not body rotation, was observed in the tail-hang test. These animals also showed corneal opacity. Histological analysis confirmed that vestibular damage occurred on both sides after unilateral administration (Figs. 6E–H). Complete loss of HC bundles in the crista receptors and very extensive loss in the utricle receptors occurred in both the injected (Figs. 6E and 6F) and the contralateral (Figs. 6G and 6H) sides.

None of the animals administered 0.50 mmol of 4-hydroxybut-2-enitrile or 3,4-dihydroxybutyronitrile showed any evidence of unilateral or bilateral vestibular dysfunction. On SEM analysis, the vestibular sensory epithelia of both the injected side (Fig. 7) and the contralateral side (not shown) displayed a control-like density of hair bundles.

In Vitro Effects of Allylnitrile and Its Derivatives

Utricles maintained in culture with no nitrile treatment showed a high density of HCs as assessed by myosin VIIa

immunoreactivity and phalloidin labeling (Fig. 8A). No qualitative difference was observed between nonexposed ($n = 8$) and vehicle ($n = 44$) controls. This was confirmed by quantitative analysis, which resulted in 72.1 ± 4.5 versus 79.3 ± 11.3 HCs per field for nonexposed and vehicle-exposed utricles, respectively ($X + SE$, $n = 4/\text{group}$). At the scanning electron microscope, most utricles displayed evidence of missing or abnormal hair bundles, in comparison with intact utricles from *in vivo* experiments, but a high density of hair bundles was nevertheless present (Fig. 8B). Preliminary observations with 3,4-epoxybutyronitrile indicated that this compound caused HC loss starting at submillimolar concentrations. Subsequent comparison of all the compounds under study (Fig. 8) showed that the epoxide derivative of allylnitrile, 3,4-epoxybutyronitrile, caused complete loss of utricle HCs at 325 and 450 μM , whereas allylnitrile, 3,4-dihydroxybutyronitrile, and 4-hydroxybut-2-enitrile caused no evidence of toxicity at concentrations of up to 1.5 mM. In the utricles exposed to 325 or 450 μM of 3,4-epoxybutyronitrile, both myosin VIIa immunostaining and phalloidin labeling were completely lost (Fig. 8A). SEM also showed complete loss of the epithelial surface and HCs (Fig. 8B).

DISCUSSION

The present study addressed the hypothesis that the metabolism of allylnitrile to 3,4-epoxybutyronitrile, possibly followed by further metabolism to 3,4-dihydroxybutyronitrile, is the bioactivation pathway for its vestibular toxicity. In a previous study (Boadas-Vaello *et al.*, 2009), we concluded that the alternate pathway, hydroxylation of the α -carbon to the nitrile to form a cyanohydrin followed by cyanide release, is unlikely to

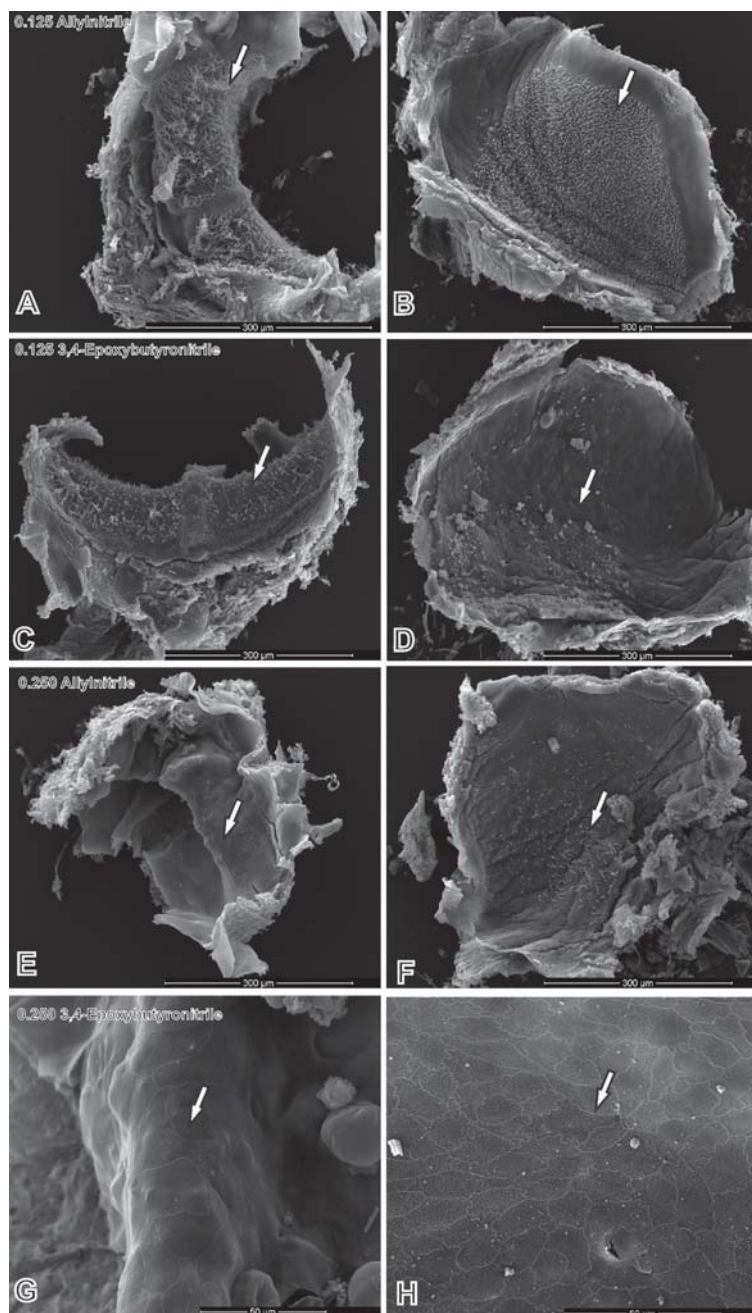


FIG. 5. Effects of bilateral transtympanic administration of allylnitrile (A, B, E, and F) or 3,4-epoxybutyronitrile (C, D, G, and H) on the vestibular sensory epithelia of the rat, as observed by SEM. (A) Crista and (B) utricle of a rat administered 0.125 mmol/ear of allylnitrile that showed no difference from control epithelia. Each sensory HC is identified by a bundle of stereocilia protruding from the epithelial surface (arrows). (C) Crista and (D) utricle of a rat administered 0.125 mmol/ear of 3,4-epoxybutyronitrile; note the scarcity of hair bundles in the crista (arrow in C) and the lack of bundles in the utricle (arrow in D). (E) Almost complete loss of hair bundles in the crista of the worst case example after 0.250 mmol/ear of allylnitrile. (F) Utricle of the same animal shown in (E); note that there is extensive loss of hair bundles, but many remain in place (arrow). (G and H) Crista and utricle after 0.250 mmol/ear of 3,4-epoxybutyronitrile; note the complete absence of hair bundles and the large surfaces of the remaining supporting cells, which indicates loss of these cells also. Scale bars: 300 μm (A–F), 50 μm (G and H).

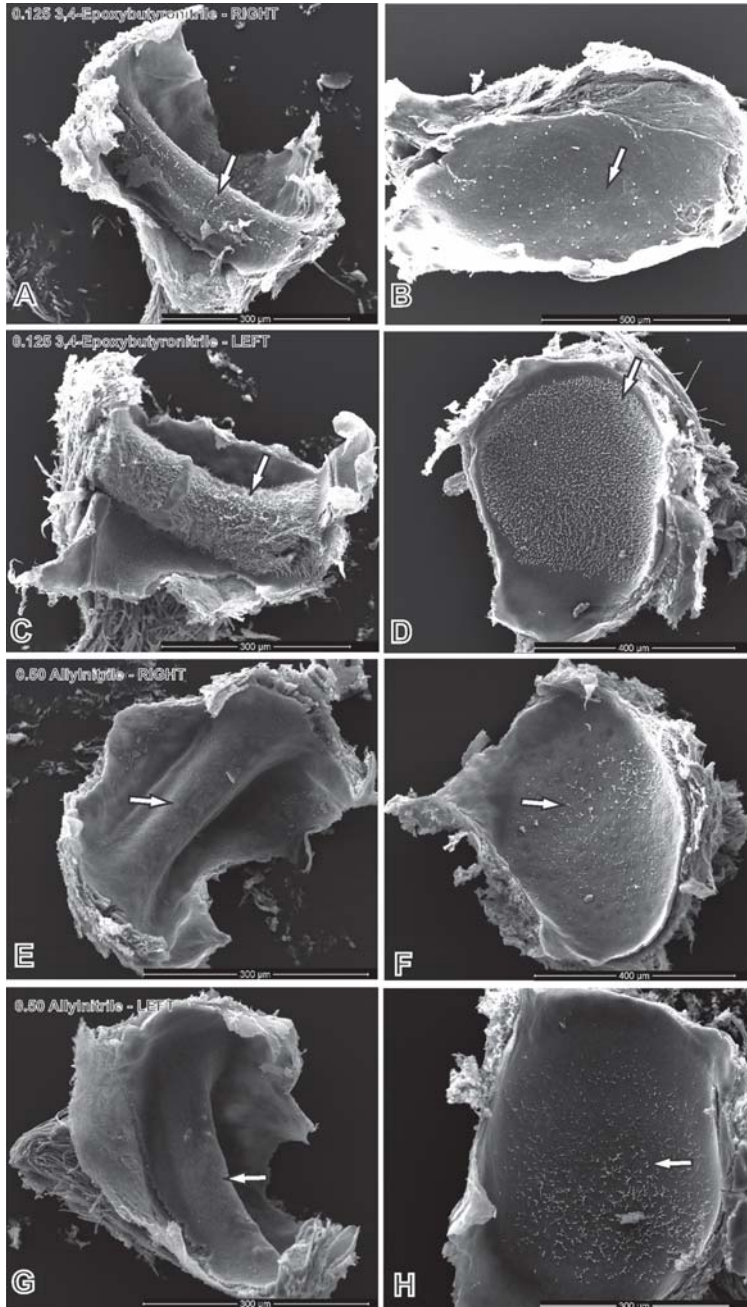


FIG. 6. Effects of unilateral transtympanic administration of 0.125 mmol 3,4-epoxybutyronitrile (A, B, C, and D) or 0.5 mmol allylnitrile (E, F, G, and H) on the vestibular sensory epithelia of the rat, as observed by SEM. Nitriles were administered to the right ear only. (A) Right crista and (B) right utricle of a rat administered 3,4-epoxybutyronitrile showing very extensive (crista) and complete (utricle) loss of HCs. (C and D) Epithelia from the left ear of the same rat as shown in (A and B), displaying a control-like density of hair bundles. (E) Right crista and (F) right utricle of a rat administered allylnitrile showing virtually complete (crista) and very extensive (utricle) loss of HCs. (G and H) Epithelia from the left ear of the same rat shown in (E and F), displaying an extensively damaged appearance similar to that of the injected right side. In all panels, arrows point to the surface of the sensory epithelium. Scale bars: 300 μm (A, C, E, G, and H), 400 μm (D and F), 500 μm (B).

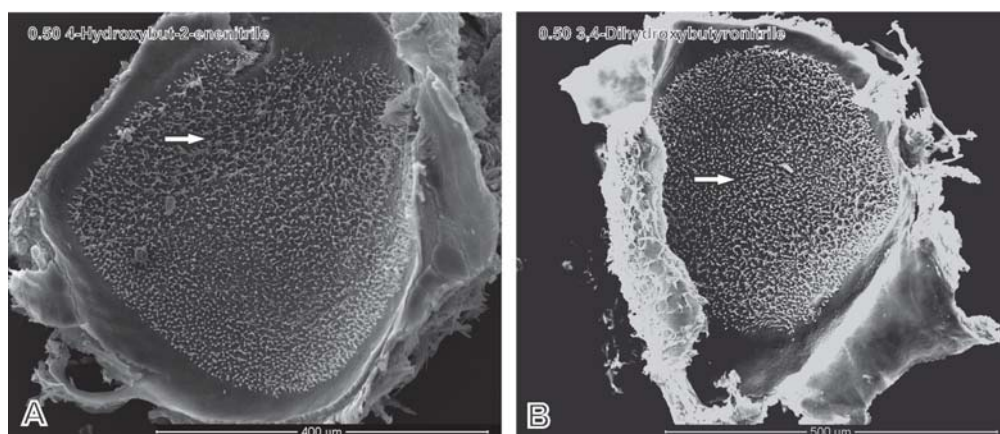


FIG. 7. Effects of unilateral transtympanic administration of 0.5 mmol 4-hydroxybut-2-enitrile (A) or 3,4-dihydroxybutyronitrile (B). In both cases, the utricle of the injected (right) ear is shown, and a control-like density of hair bundles (arrows) is observed. Scale bars: 400 μm (A), 500 μm (B).

be the bioactivation pathway for vestibular toxicity but likely to mediate acute lethality. In the present study, the hypothesized allylnitrile metabolites were synthesized, characterized, and evaluated for vestibular toxicity in *in vivo* and *in vitro* models.

The toxicity of the candidate compounds was evaluated in rats *in vivo* and in mouse utricles *in vitro*. We used two species for practical and financial reasons. Transtympanic administration is easier in rats than in mice due to body size, and the use of mice for utricular explant cultures allowed us to significantly reduce the cost of the studies. We are confident that the use of different species does not alter the value of our conclusions, because similar vestibular toxicity is observed following allylnitrile exposure in rats (Balbuena and Llorens, 2001; Gagnaire *et al.*, 2001) and mice (Boadas-Vaello *et al.*, 2009; Saldaña-Ruiz *et al.*, 2012b), as could be predicted from previously available behavioral data (Tanii *et al.*, 1989, 1991).

Using transtympanic exposure, we aimed to obtain evidence of the direct ototoxic effect of the compounds *in vivo*. In rats exposed bilaterally, vestibular toxicity could be assessed by means of a well-characterized battery of tests for vestibular dysfunction (Boadas-Vaello *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997). With this model, we compared the vestibular toxicity of allylnitrile with that of 3,4-epoxybutyronitrile, hypothesized to be its product by CYP-mediated metabolism. The data demonstrated that 3,4-epoxybutyronitrile causes vestibular dysfunction at doses lower than the doses of allylnitrile necessary for a similar effect. The conclusion that the epoxide derivative of allylnitrile is more toxic to the vestibular system than the parent compound was also demonstrated by histological analysis. The pattern of damage differed between the two compounds, with allylnitrile showing a pattern similar to that found after oral or ip administration (crista receptors are more affected than utricles) in contrast to the presence of more extensive damage in the utricles than in crista following exposure to 3,4-epoxybutyronitrile. These patterns of damage

suggest that 3,4-epoxybutyronitrile caused its effects by direct entrance from the middle to the inner ear, whereas allylnitrile could have caused its effects through whole body exposure, as suggested by the presence of corneal clouding in the allylnitrile animals. These hypotheses were confirmed by the unilateral exposure experiments. 3,4-Epoxybutyronitrile caused unilateral vestibular toxicity after unilateral exposure at the same dose/ear previously observed to cause vestibular toxicity after bilateral exposure. In contrast, allylnitrile caused symmetrical bilateral vestibular toxicity after unilateral exposure and was also associated with corneal toxicity. The unilateral effective dose was the same total dose (i.e., twice the dose/ear) effective after bilateral exposure. Thus, transtympanic exposure to allylnitrile did not cause vestibular toxicity by local action, but through absorption and whole body blood distribution.

We also examined *in vivo* the vestibular toxicity of 3,4-dihydroxybutyronitrile and 4-hydroxybut-2-enitrile. The first compound was the hypothetical result of the action of epoxide hydrolase activities on 3,4-epoxybutyronitrile, with a similarity to the known metabolic pathways of acrylonitrile (El Hadri *et al.*, 2005; Kedderis and Batra, 1993). The second was identified as the spontaneous rearrangement product of 3,4-epoxybutyronitrile in PBS and in potassium phosphate buffer, so it is expected that this rearrangement would actually occur in both the intracellular and extracellular compartments *in vivo*. Due to the chemical instability and expected reactivity of the epoxide, we initially hypothesized that one of the two more stable and probably less reactive compounds would be the circulating ototoxic compound. However, neither of these two compounds caused significant vestibular toxicity by unilateral transtympanic exposure at doses four times (0.5 mmol) the effective dose of 3,4-epoxybutyronitrile (0.125 mmol).

The *in vitro* data also supported the conclusion that the epoxide, that is, 3,4-epoxybutyronitrile, is more toxic to the vestibular system than either the parent allylnitrile or the other candidate

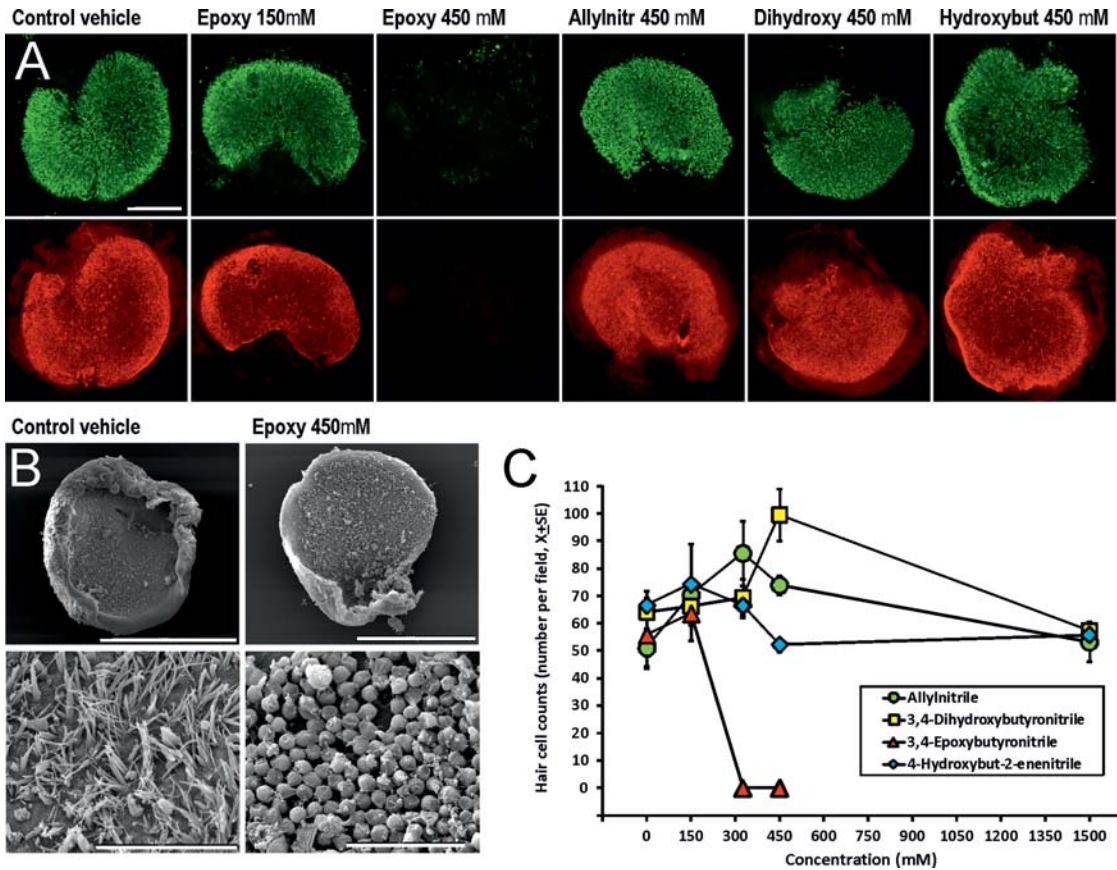


FIG. 8. Effects of 3,4-epoxybutyronitrile (epoxy), allylnitrile (allylnitr), 3,4-dihydroxybutyronitrile (dihydroxy), and 4-hydroxybut-2-enitrile (hydroxybut) on the vestibular utricle cultures. (A) Control and treated utricles immunolabeled with anti-myosin VIIa antibodies (top row) to label the sensory HCs, and phalloidin (bottom row) to stain actin fibers. Note the complete loss of labeling in the utricle exposed to 450 μ M of 3,4-epoxybutyronitrile, but the control-like appearance of utricles exposed to a lower concentration (150 μ M) or to the same concentration of other compounds. The scale bar in top left panel indicates 100 μ m and applies to all panels. (B) SEM views of a vehicle control utricle (left images) or a utricle exposed to 450 μ M of 3,4-epoxybutyronitrile (right images). The sensory epithelium is dramatically altered, with no remaining typical surface features, such as hair bundles from the sensory cells or surface microvillousities from the supporting cells. Globular-shaped cells are observed attached to the basal lamina (arrow). Scale bars: 300 μ m (top panels) and 30 μ m (bottom panels). (C) Cell counts based on high magnification of phalloidin-stained epithelium. Each point is the mean from two to four utricles, each assessed by counting of four to six images.

derivatives, 3,4-dihydroxybutyronitrile and 4-hydroxybut-2-enitrile. At concentrations of 325 and 450 μ M, the epoxy derivative caused a complete loss of the sensory epithelium, whereas the other compounds did not show significant vestibular toxicity at these or higher (1.5mM) concentrations.

Taken together, the data in the present work support the hypothesis that 3,4-epoxybutyronitrile might be the ototoxic metabolite of allylnitrile. Future work may provide further support for the hypothesis and expand the understanding of nitrile-induced vestibular toxicity. Demonstration that 3,4-epoxybutyronitrile is actually formed by the metabolism of allylnitrile is a pending task. We aimed to indicate the presence of this epoxy in the blood of allylnitrile-exposed animals, or in hepatic microsome preparations incubated with allylnitrile,

but our initial attempts were hampered by the lack of an adequate analytical method. Assays based on modifications of our previously developed method for allylnitrile and cyanide analysis in blood by solid-phase microextraction-gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection (Boadas-Vaello *et al.*, 2008) were found to be unsuitable for the analysis of the derivatives under study (unpublished results). Another area for future research is the selectivity of ototoxic action. The present *in vitro* experiments showed massive damage to the epithelium by 3,4-epoxybutyronitrile, which is in contrast to the selective degeneration of HCs with sealing of the scars by supporting cell extension that characterizes ototoxic damage *in vivo* (Hordichok and Steyger, 2007; Llorens and Demêmes, 1994; Meiteles and Raphael, 1994). Thus, more histological data are

necessary to demonstrate that 3,4-epoxybutyronitrile has selective toxic action on HCs, as observed after *in vivo* systemic exposure to ototoxic nitriles. Finally, research on the mechanism of action of nitriles on HCs is necessary. This goal can be addressed in the future using *in vitro* models.

The question of nitrile bioactivation for toxicity was previously addressed for IDPN. According to Sayre and colleagues, metabolism of that compound would generate N-hydroxy-IDPN and 3-(2-cyanoethylamino)acrylonitrile (Jacobson *et al.*, 1987). In subsequent studies, N-hydroxy-IDPN was shown to be more toxic than IDPN (Morandi *et al.*, 1987; Nace *et al.*, 1997), although the toxic metabolite has not yet been unequivocally identified. By analogy, 3,4-dihydroxybutyronitrile or 4-hydroxybut-2-enitrile were obvious candidates as the ototoxic metabolites of allylnitrile. Furthermore, because the expected life of 3,4-epoxybutyronitrile was short and its reactivity was likely high, it was not an obvious choice as a circulating ototoxic compound. However, in this study, 3,4-epoxybutyronitrile was shown to be directly toxic to the vestibular sensory epithelia, in surprising contrast to the negative data collected regarding the other two compounds. It is thus possible that the chemical properties of the epoxide are responsible for the steepness of the dose-response curve of allylnitrile vestibular toxicity (Balbuena and Llorens, 2001) and the small range of doses that are effective to lethal (Balbuena and Llorens, 2001; Saldaña-Ruiz *et al.*, 2012b) in contrast to the larger range that characterize IDPN vestibular toxicity (Llorens *et al.*, 1993). Additional work is required to study whether these properties of IDPN depend on the fact that its toxicity is caused by one of the compounds indicated above or on the lower reactivity of a yet unidentified epoxide metabolite that mediates the IDPN vestibular effects.

In conclusion, three derivatives of allylnitrile that could mediate the ototoxic properties of the parent nitrile were synthesized and evaluated for vestibular toxicity both *in vivo* and *in vitro*. One of these compounds, 3,4-epoxybutyronitrile was found to be directly toxic to the vestibular sensory epithelia. Whether epoxide or other functional groups are responsible for the bioactivation of the other ototoxic nitriles, namely IDPN, *cis*-crotonitrile, and *cis*-2-pentenenitrile, remains an open question for future investigations.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://toxsci.oxfordjournals.org/>.

FUNDING

Ministry of Science and Innovation (Spain) [grant numbers BFU2009-06945, BFU2012-31164, SAF2011-30542-C01-01]; Generalitat of Catalonia [grant number 2009 SGR 1059]. G.H.-M. was supported by a fellowship of the FPU Program, Ministry of Education, Culture and Sports (Spain).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antoni Massana Llorca, Angélique Greco, Ingrid Gentil, Minerva Fernández Rosendo, Carla Soler-Martín, Carmen Domínguez, and Sophie Gaboyard for their contributions to the study. The SEM and fluorescence microscopy studies were performed at the Science and Technology Centers of the University of Barcelona. C.C. and J.L. are members of the Scientific Advisory Board of Sensorion Pharmaceuticals, a company that generates therapies for vestibular disorders.

REFERENCES

- Arnone, A., Bravo, P., Frigerio, M., Salani, G., Viani, F., Zappalà, C., Cavicchio, G., and Crucianelli, M. (1995). Synthesis of fluorinated chirons: Stereoselective oxirane formation by reaction of diazomethane on 1-fluoro-2-arylsulfinyl-2-propanone and ring opening by selected nucleophiles. *Tetrahedron* **51**, 8289–8310.
- Balbuena, E., and Llorens, J. (2001). Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res.* **904**, 298–306.
- Balbuena, E., and Llorens, J. (2003). Comparison of *cis*- and *trans*-crotonitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **187**, 89–100.
- Boadas-Vaello, P., Jover, E., Díez-Padrís, N., Bayona, J. M., and Llorens, J. (2007). Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of *cis*-crotonitrile in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **225**, 310–317.
- Boadas-Vaello, P., Jover, E., Llorens, J., and Bayona, J. M. (2008). Determination of cyanide and volatile alkyl nitriles in whole blood by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **870**, 17–21.
- Boadas-Vaello, P., Jover, E., Saldaña-Ruiz, S., Soler-Martín, C., Chabbert, C., Bayona, J. M., and Llorens, J. (2009). Allylnitrile metabolism by CYP2E1 and other CYPs leads to distinct lethal and vestibulotoxic effects in the mouse. *Toxicol. Sci.* **107**, 461–472.
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., and Llorens, J. (2005). Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol. Sci.* **88**, 456–466.
- Camps, F., Coll, J., Messeguer, A., and Pericas, M. A. (1981). Improved oxidation procedure with aromatic peroxyacids. *Tetrahedron Lett.* **22**, 3895–3896.
- Crofton, K. M., and Knight, T. (1991). Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* **13**, 575–581.
- Cunningham, L. L. (2006). The adult mouse utricle as an *in vitro* preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain Res.* **1091**, 277–281.
- Cunningham, L. L., Cheng, A. G., and Rubel, E. W. (2002). Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J. Neurosci.* **22**, 8532–8540.
- Denlinger, R. H., Anthony, D. C., Amarnath, K., Amarnath, V., and Graham, D. G. (1994). Metabolism of 3,3'-iminodipropionitrile and deuterium-substituted analogs: Potential mechanisms of detoxification and activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **124**, 59–66.
- Denlinger, R. H., Anthony, D. C., Amarnath, V., and Graham, D. G. (1992). Comparison of location, severity, and dose response of proximal axonal lesions induced by 3,3'-iminodipropionitrile and deuterium substituted analogs. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**, 569–576.
- DeVito, S. C. (1996). Designing safer nitriles. In *Designing Safer Chemicals* (S. C. DeVito and R. L. Garrett, Eds.), pp. 194–223. American Chemical Society, Washington, DC.

- DeVito, S. C. (2007). Nitriles. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed. (M. Howe-Grant, Ed.), Vol. 17, 227–249. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- El Hadri, L., Chanas, B., and Ghanayem, B. I. (2005). Comparative metabolism of methacrylonitrile and acrylonitrile to cyanide using cytochrome P4502E1 and microsomal epoxide hydrolase-null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**, 116–125.
- Fleming, F. F., Wang, Q., and Steward, O. W. (2001). Hydroxylated alpha,beta-unsaturated nitriles: Stereoselective synthesis. *J. Org. Chem.* **66**, 2171–2174.
- Gagnaire, F., Marignac, B., Ban, M., and Langlais, C. (2001). The ototoxic effects induced in rats by treatment for 12 weeks with 2-butenitrile, 3-butenitrile and cis-2-pentenitrile. *Pharmacol. Toxicol.* **88**, 126–134.
- Genter, M. B., Llorens, J., O'Callaghan, J. P., Peele, D. B., Morgan, K. T., and Crofton, K. M. (1992). Olfactory toxicity of beta,beta'-iminodipropionitrile in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 1432–1439.
- Hasson, T., Gillespie, P. G., Garcia, J. A., MacDonald, R. B., Zhao, Y., Yee, A. G., Mooseker, M. S., and Corey, D. P. (1997). Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.* **137**, 1287–1307.
- Hordichok, A. J., and Steyger, P. S. (2007). Closure of supporting cell scar formations requires dynamic actin mechanisms. *Hear. Res.* **232**, 1–19.
- Horn, K. M., DeWitt, J. R., and Nielson, H. C. (1981). Behavioral assessment of sodium arsenite induced vestibular dysfunction in rats. *Physiol. Psychol.* **9**, 371–378.
- Jacobson, A. R., Coffin, S. H., Shearson, C. M., and Sayre, L. M. (1987). beta,beta'-Iminodipropionitrile (IDPN) neurotoxicity: A mechanistic hypothesis for toxic activation. *Mol. Toxicol.* **1**, 17–34.
- Janning, M. H., Whitworth, C. A., and Rybak, L. P. (1998). Experimental model of cisplatin ototoxicity in chinchillas. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **119**, 574–580.
- Jones, D. A. (1998). Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* **47**, 155–162.
- Jung, M. E., and Shaw, T. J. (1980). Total synthesis of (R)-glycerolacetone and the antiepileptic and hypotensive drug (-)-gamma-amino-beta-hydroxybutyric acid (GABOB): Use of vitamin C as a chiral starting material. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 6304–6311.
- Kedderis, G. L., and Batra, R. (1993). Species differences in the hydrolysis of 2-cyanoethylene oxide, the epoxide metabolite of acrylonitrile. *Carcinogenesis* **14**, 685–689.
- Leary Swan, E. E., Mescher, M. J., Sewell, W. F., Tao, S. L., and Borenstein, J. T. (2008). Inner ear drug delivery for auditory applications. *Adv. Drug Del. Rev.* **60**, 1583–1599.
- Llorens, J., and Crofton, K. M. (1991). Enhanced neurotoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile following carbon tetrachloride pretreatment in the rat. *Neurotoxicology* **12**, 583–594.
- Llorens, J., and Demêmes, D. (1994). Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia. *Hear. Res.* **76**, 78–86.
- Llorens, J., Demêmes, D., and Sans, A. (1993). The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **123**, 199–210.
- Llorens, J., and Rodríguez-Farré, E. (1997). Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* **19**, 117–127.
- Llorens, J., Soler-Martín, C., Saldaña-Ruiz, S., Cutillas, B., Ambrosio, S., and Boadas-Vaello, P. (2011). A new unifying hypothesis for lathyrism, konzo and tropical ataxic neuropathy: Nitriles are the causative agents. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 563–570.
- Lysakowski, A., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chatlani, S., Price, S. D., and Eatock, R. A. (2011). Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *J. Neurosci.* **31**, 10101–10114.
- Meiteles, L. Z., and Raphael, Y. (1994). Scar formation in the vestibular sensory epithelium after aminoglycoside toxicity. *Hear. Res.* **79**, 26–38.
- Morandi, A., Gambetti, P., Arora, P. K., and Sayre, L. M. (1987). Mechanism of neurotoxic action of beta,beta'-iminodipropionitrile (IDPN): N-hydroxylation enhances neurotoxic potency. *Brain Res.* **437**, 69–76.
- Nace, C. G., Genter, M. B., Sayre, L. M., and Crofton, K. M. (1997). Effect of methimazole, an FMO substrate and competitive inhibitor, on the neurotoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in male rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **37**, 131–140.
- Nudelman, A., and Keinan, E. (1982). Ene-dicarbonyl systems: An efficient synthesis of 3-cyano propenal and 2-cyanovinyl ketones (4-oxo-2-alkenenitriles). *Synthesis* **1982**, 687–689.
- Ogata, Y., and Slepecky, N. B. (1998). Immunocytochemical localization of calmodulin in the vestibular end-organs of the gerbil. *J. Vestib. Res.* **8**, 209–216.
- Osborn, M., and Weber, K. (1982). Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: Tubulin-containing structures. *Methods Cell Biol.* **24**, 97–132.
- Parnes, L. S., Sun, A. H., and Freeman, D. J. (1999). Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: An animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* **109**(Suppl. 91), 1–17.
- Sahly, I., El-Amraoui, A., Abitbol, M., Petit, C., and Dufier, J. L. (1997). Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis. *Anat. Embryol. (Berl.)* **196**, 159–170.
- Saldaña-Ruiz, S., Hernández-Mir, G., Sedó-Cabezón, L., Cutillas, B., and Llorens, J. (2012a). Vestibular toxicity of cis-2-pentenitrile in the rat. *Toxicol. Lett.* **211**, 281–288.
- Saldaña-Ruiz, S., Soler-Martín, C., and Llorens, J. (2012b). Role of CYP2E1-mediated metabolism in the acute and vestibular toxicities of nineteen nitriles in the mouse. *Toxicol. Lett.* **208**, 125–132.
- Saxon, D. W., and White, G. (2006). Episodic vestibular disruption following ablation of the inferior olive in rats: Behavioral correlates. *Behav. Brain Res.* **175**, 128–138.
- Selye, H. (1957). Lathyrism. *Rev. Can. Biol.* **16**, 1–82.
- Seoane, A., Apps, R., Balbuena, E., Herrero, L., and Llorens, J. (2005). Differential effects of trans-crotonitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 880–894.
- Seoane, A., Demêmes, D., and Llorens, J. (2001). Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *J. Comp. Neurol.* **439**, 385–399.
- Seoane, A., Espejo, M., Pallás, M., Rodríguez-Farré, E., Ambrosio, S., and Llorens, J. (1999). Degeneration and gliosis in rat retina and central nervous system following 3,3'-iminodipropionitrile exposure. *Brain Res.* **833**, 258–271.
- Sera, K., Harada, Y., Tagashira, N., Suzuki, M., Hirakawa, K., and Ohya, T. (1987). Morphological changes in the vestibular epithelia and ganglion induced by ototoxic drug. *Scanning Microsc.* **1**, 1191–1197.
- Soler-Martín, C., Díez-Padrisa, N., Boadas-Vaello, P., and Llorens, J. (2007). Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol. Sci.* **96**, 123–132.
- Tanii, H., Hayashi, M., and Hashimoto, K. (1991). Behavioral syndrome induced by allylnitrile, crotonitrile or 2-pentenitrile in rats. *Neuropharmacology* **30**, 887–892.
- Tanii, H., Kurosaka, Y., Hayashi, M., and Hashimoto, K. (1989). Allylnitrile: A compound which induces long-term dyskinesia in mice following a single administration. *Exp. Neurol.* **103**, 64–67.
- Tanii, H., Takayasu, T., Higashi, T., Leng, S., and Saijoh, K. (2004). Allylnitrile: Generation from cruciferous vegetables and behavioral effects on mice of repeated exposure. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 453–458.
- Vignaux, G., Chabbert, C., Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Machado, M. L., Denise, P., Comoz, F., Hitier, M., Landemore, G., Philoxène, B., et al. (2012). Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsenite in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258**, 61–71.



Vestibular damage in chronic ototoxicity: A mini-review



Lara Sedó-Cabezón^a, Pere Boadas-Vaello^b, Carla Soler-Martín^a, Jordi Llorens^{a,c,*}

^a Department de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

^b NEOMA Research Group, Departament de Ciències Mèdiques, Facultat de Medicina, Universitat de Girona, 17071 Girona, Catalonia, Spain

^c Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2013

Accepted 28 November 2013

Available online 10 December 2013

Keywords:

Hair cells

Inner ear

Ototoxicity

Audiovestibular ganglion neurons

Aminoglycoside antibiotics

Nitrites

ABSTRACT

Ototoxicity is a major cause of the loss of hearing and balance in humans. Ototoxic compounds include pharmaceuticals such as aminoglycoside antibiotics, anti-malarial drugs, loop diuretics and chemotherapeutic platinum agents, and industrial chemicals including several solvents and nitriles. Human and rodent data indicate that the main target of toxicity is hair cells (HCs), which are the mechanosensory cells responsible for sensory transduction in both the auditory and the vestibular system. Nevertheless, the compounds may also affect the auditory and vestibular ganglion neurons. Exposure to ototoxic compounds has been found to cause HC apoptosis, HC necrosis, and damage to the afferent terminals, of differing severity depending on the ototoxicity model. One major pathway frequently involved in HC apoptosis is the c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway activated by reactive oxygen species, but other apoptotic pathways can also play a role in ototoxicity. Moreover, little is known about the effects of chronic low-dose exposure. In rodent vestibular epithelia, extrusion of live HCs from the sensory epithelium may be the predominant form of cell demise during chronic ototoxicity. In addition, greater involvement of the afferent terminals may occur, particularly the calyx units contacting type I vestibular HCs. As glutamate is the neurotransmitter in this synapse, excitotoxic phenomena may participate in afferent and ganglion neuron damage. Better knowledge of the events that take place in chronic ototoxicity is of great interest, as it will increase understanding of the sensory loss associated with chronic exposure and aging.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Impaired function of the vestibular system causes vertigo, loss of balance and loss of gaze fixation during movement, often accompanied by dizziness and nausea. In humans, one cause is the toxicity of some pharmaceuticals, including aminoglycoside antibiotics, anti-malarial drugs, loop diuretics, and the chemotherapeutic agent cisplatin (Rybak (2007); Rybak and Whitworth, 2005; Schacht et al., 2012; Yorgason et al., 2006). Workplace chemicals with potential inner ear toxicity include several solvents such as toluene, styrene and trichlorethylene and synthetic intermediates such as cis-2-pentenenitrile (Fechter et al., 1998; Hoet and Lison, 2008; Perrine and Dominique (2008); Pouyatos et al., 2002; Saldaña-Ruiz et al., 2012; Campo et al., 2013). These and other compounds are ototoxic, that is, toxic to both the vestibular and auditory sensory systems. The main targets of toxicity are the hair cells (HCs), which are the mechanosensory

cells responsible for the transduction of sound waves and of head accelerations, including gravity and those resulting from linear and rotational movements of the head. Their name refers to the apical bundles of specialized microvilli, known as stereocilia, that contain the molecular machinery for mechano-electrical transduction. Mature vestibular HCs also have one single cilium, named a kinocilium, while auditory HCs lose their kinocilium during maturation.

Animal studies with acute or short-term repeated exposure models have clearly demonstrated that ototoxic compounds may cause permanent disability due to degeneration of most or all of the HCs, because these cells cannot regenerate, or do so to a very limited extent in most mammalian species (Forge and Schacht, 2000; Groves, 2010; Llorens et al., 1993; Rubel et al., 2013). However, on many occasions, vestibular dysfunction appears progressively as a result of a mild but persistent stress to the system, as may occur in chronic aminoglycoside treatment. If the stress is removed, as for instance by halting drug use, the symptoms may fully persist, or decrease up to either complete or incomplete recovery (Black et al., 2001, 2004). The events taking place during the progressive injury that causes slowly appearing symptoms of ototoxicity, which may be partly or fully reversible, are scarcely established. A deep understanding of these processes

* Corresponding author at: Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain.

Tel.: +34 93 402 4277; fax: +34 93 402 4268.

E-mail address: jlllorens@ub.edu (J. Llorens).

is of great interest for several reasons. First, the slow damage process may be a target for therapeutic intervention aimed at blocking its progression before irreversible events take place. Second, the recovery process may be a target for therapeutic intervention aimed at shortening the time of recovery or at ameliorating the final outcome of the process, i.e., turning partial recovery into better or full recovery. Third, knowledge of the events that take place during damage and repair will undoubtedly shed light on the basic processes involved in the physiology and homeostasis of the system. Fourth, slow damage mechanisms are probably involved in the sensory loss commonly associated with aging. While presbycusis (age-related hearing loss) is a widely recognized phenomenon, age-related loss of vestibular function is much less known, but has a similar high incidence. It may affect as much as 65% and 85% of people over 60 and 80 years respectively, and it constitutes a significant risk factor for falls (Agrawal et al., 2009; Ishiyama, 2009). Loss of sensory functions is one major determinant of the deterioration of quality of life during aging, and to what extent chronic neurotoxicity is responsible for this functional decline is an important open question. As in neurodegenerative diseases, sensory decline was once assumed to be an unavoidable consequence of natural aging. However, it is increasingly accepted that it is the end result of null or limited capacity for regeneration combined with the damaging consequences of different insults, including toxic insults, which may be avoidable, at least in part.

The main purpose of the present paper is to review the scarce data available on the cellular and molecular events that operate in slowly progressing damage in the mammalian vestibular system resulting from chronic toxic exposure. To give a more comprehensive view of the field, the data on HC degeneration from other exposure models and in other related epithelia are also briefly reviewed, but an extensive presentation of these aspects is beyond the scope of the present review. Other recent reviews are available that cover the best-known aspects of HC degeneration following ototoxic exposure (Cheng et al., 2005; Forge and Schacht, 2000; Guthrie, 2008; Li and Steyger, 2009; Op de Beeck et al., 2011; Schacht et al., 2012; Warchol, 2010; Xie et al., 2011; Yorgason et al., 2011).

2. Vestibular sensory epithelia

There are five vestibular sensory epithelia in each ear: three cristas, one utricle and one saccule. All of them contain two morphological types of HCs, known as type I (HCI) and type II (HCII) (Fig. 1). In the auditory system, a single sensory epithelium, known as the organ of Corti, contains two types of HCs, outer HCs (OHCs) and inner HCs (IHCs). In all HCs, deflection of the stereocilia opens the mechano-electrical transduction channels at the tips of the stereocilia, allowing a cation current to flow and depolarize the cell. Vestibular HCs are presynaptic to afferent terminals of the vestibular ganglion neurons, and depolarization leads to neurotransmitter release at the basolateral membrane of the cell. The neurotransmitter is glutamate and this makes the post-synaptic afferent terminals a candidate target for excitotoxic damage. HCII are contacted by button afferent terminals, and these synapses are surrounded by supporting cells that express EAAT1 (excitatory amino acid transporter 1, also known as GLAST) for glutamate clearance (Takumi et al., 1997). The contact between the HCI and their afferent terminals is a very unique structure. The cell has an amphora-like shape, and the terminal has a calyx shape that envelope the cell up to its neck. Growth of the calyx afferents during development depends on trophic signals secreted by the HCs, including BDNF acting through TrkB/PLC γ (tyrosine kinase receptor B/phospholipase C gamma) signaling in the nerve terminals (Sciarretta et al., 2010). Scaffolding, cell adhesion,

extracellular matrix proteins, and ion channels have now been identified and shown to form several microdomains within the calyx membrane (Lysakowski et al., 2011). The HCI-calyx ending contact is a very unique setting with regard to excitotoxicity potential, because the calyx separates the synaptic cleft from the neighboring supporting cells, and this makes it impossible to remove glutamate by EAAT1. Recent data (Dalet et al., 2012) indicate that HCs express the excitatory aminoacid transporters EAAT4 and EAAT5, whose particular kinetics may match the exceptional arrangement of this synaptic contact with regard to the regulation of glutamate concentrations in the synaptic cleft.

3. Experimental models in ototoxicity research

Experimental research into ototoxic damage has largely focused on clinically important drugs, such as the aminoglycosides and the chemotherapeutic drug cisplatin. Data from the temporal bones of patients exposed to these drugs indicated that HCs are the main target and that persistent hearing or balance loss after exposure to these compounds is usually associated with loss of HCs. However, other effects, such as damage to the stria vascularis and loss of the spiral and vestibular ganglia neurons, have also been observed. Animal studies in a variety of species have corroborated these findings (reviewed by Guthrie, 2008; Schacht et al., 2012).

In many species, ototoxic drugs have other toxic effects that compromise survival, such as renal toxicity, and this makes it difficult to establish good animal models to study ototoxicity. Rats and mice are comparatively resilient to aminoglycoside-induced HC toxicity, whereas guinea pigs are more susceptible to this toxicity and have the advantage of a large inner ear; so this last species has frequently been chosen for this research (Forge and Schacht, 2000; Li et al., 1995). Another particularly sensitive species is the chinchilla, and a number of studies have been carried out on this species (see McFadden et al., 2002; Yorgason et al., 2011). As well as some studies in other mammalian species (see Yorgason et al., 2011), many studies of avian species have also been published (Mangiardi et al., 2004), as have studies of the zebrafish more recently (Chiu et al., 2008). Since the work by Wu et al. (2001), significant efforts have been devoted to establishing systemic rat and particularly mouse models of ototoxicity with the twofold aim of reaching a better understanding of ototoxicity *in vivo*, and easily causing reproducible lesions to develop protection, repair and regeneration strategies. Using repeated administration of selected aminoglycosides in selected strains, cochlear and vestibular toxicity are achieved (Wu et al., 2001; Murillo-Cuesta et al., 2009, 2010). Alternatively, partial lesions of the cochlea, usually sparing the vestibular epithelia, are obtained by acute co-administration of an aminoglycoside and a loop diuretic (Oesterle et al., 2008; Taylor et al., 2008). A similar model has been developed by co-administering cisplatin and furosemide to mice (Li et al., 2011). Other compounds, notably the nitriles, have been discovered to cause ototoxic effects in a variety of species including rats and mice with no or limited associated mortality (Balbuena and Llorens, 2001; Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Saldaña-Ruiz et al., 2013; Soler-Martín et al., 2007).

As discussed below, repeated exposure models have provided some new information on the molecular events that may be involved in ototoxicity, although these models remain sub-optimal in terms of ease of use, flexibility and the presence of other toxic effects. Although many studies have been published that provide data on ototoxicity, few canonical toxicological studies are available that use a range of doses that produce from no effect to complete lesions, or that compare different time exposure conditions (acute, sub-acute, sub-chronic and chronic).

To circumvent the systemic toxicity problem, ototoxins have on many occasions been studied by local application to the middle ear

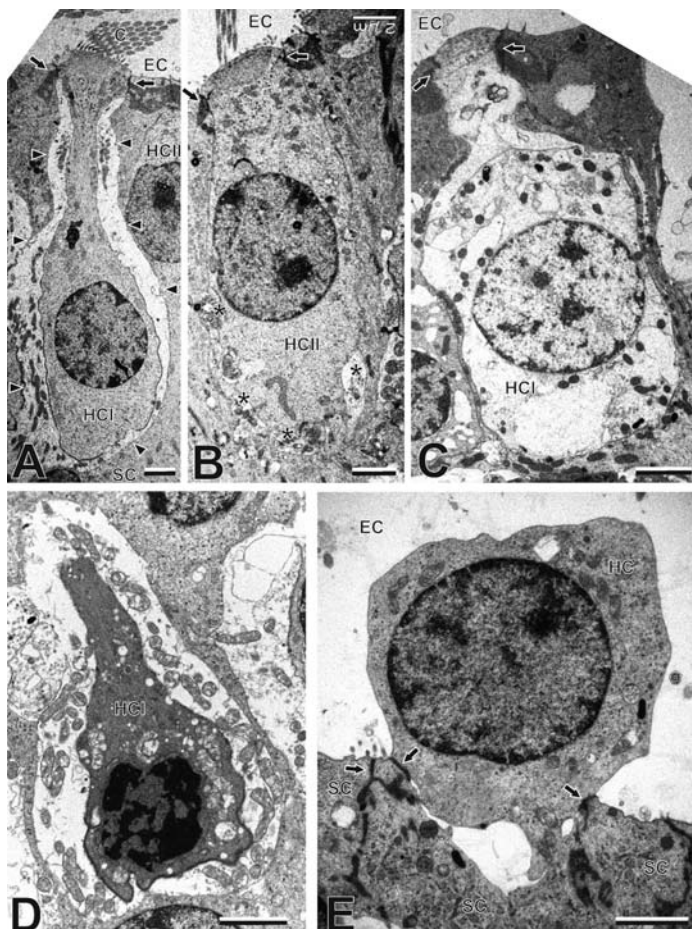


Fig. 1. Organization of the mammalian vestibular epithelia (A and B) and modes of demise of sensory hair cells (HCs) (C–E). (A and B) Vestibular epithelia from control rats. These contain two types of HCs, which extend their bundles of cilia (C) into the endolymphatic cavity (EC). Supporting cells (SC) surround the HCs. Tight junctions (arrows) between HCs and SCs and among SCs close the apical part of the epithelium to exclude the potassium-rich endolymph from the epithelium. Type I HCs (HCI) are contacted by calyx afferents (arrowheads in A) that envelope the cell, while type II HCs (HCII) are contacted by button afferents (* in B). (C) A degenerating HCI in a vestibular epithelium from a rat acutely exposed to 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), showing features of cell necrosis, nuclear swelling and cytoplasm vacuolization and swelling. (D) A degenerating HCI showing features of apoptosis, cell shrinkage, and cytoplasm and chromatin condensation, in a vestibular epithelium from a rat sub-acutely exposed to IDPN. (E) Extruding HC (type undetermined) in a vestibular epithelium from a rat chronically exposed to IDPN. The integrity of the epithelium, which is located toward the bottom of the image, is preserved by the SCs that keep their tight junctions (arrows) among them and with the HC, until the extrusion of the cell into the EC is completed. In this chronic ototoxicity model, there is a striking scarcity of major signs of damage in the cytoplasm, nucleus or mitochondria of the extruding HCs. Scale bars: 2 μ m.

of rodents, from where they diffuse into the inner ear causing auditory and vestibular toxicity with little systemic toxicity (Bauer and Brozowski, 2005; Dupont et al., 1993; Heydt et al., 2004; Lyford-Pike et al., 2007; Sera et al., 1987). Using this approach, rats and mice are as susceptible to aminoglycoside and cisplatin ototoxicities as guinea pigs are. All these studies correspond to acute toxicity.

Ototoxicity has also been studied *in vitro*, in explant cultures of the organ of Corti or the vestibular epithelia (Cunningham, 2006; Forge and Li, 2000; Kotecha and Richardson, 1994; Matsui et al., 2004). Those studies provide valuable information on the response of the HCs to ototoxic stress, but have many important limitations with regard to the understanding of chronic ototoxicity. Among other differences, the explanted epithelia lack the endolymphatic compartment and innervation.

Ototoxic drugs typically damage both the vestibular and the auditory system. However, it is important to keep in mind that research findings in one of the systems may or may not be valid in

the other. While many cellular and molecular components are similar in both systems, important differences also exist. The amount of data available on auditory toxicity is far greater than that available on vestibular toxicity, and many questions that have been investigated in the cochlea remain unexplored in the vestibular system.

4. Apoptosis and necrosis of HCs in ototoxic damage

The mechanisms responsible for the HC loss caused by ototoxic exposure have been studied in a variety of experimental models. In several acute or repeated exposure *in vivo* studies (Lenoir et al., 1999; Li et al., 1995; Llorens and Demêmes, 1994; Seoane et al., 2001a; Vago et al., 1998) transmission electron microscopy data identified mostly apoptotic, but also necrotic, patterns of HC degeneration. Ultrastructural evidence of HC apoptosis was also obtained from utricular explant cultures (Forge and Li, 2000). One specific feature of HC degeneration, which seems to be part of

the apoptosis program of the cells, is the severing of its neck and the release of its apical end, including the cuticular plate and ciliary bundle, toward the endolymphatic space. Simultaneously, supporting cells close the forming gap and preserve epithelial integrity by forming characteristic scars that impede the exposure of the basolateral membranes of the epithelial cells to the potassium rich endolymph (Forge, 1985; Leonova and Raphael, 1997).

The molecular pathways involved in the apoptosis of mammalian HCs induced by ototoxic insults have mainly been studied in the organ of Corti and utricular explants exposed to either aminoglycosides or cisplatin. The data available (reviewed by Casares et al., 2012; Cheng et al., 2005; Guthrie, 2008; Op de Beeck et al., 2011; Schacht et al., 2012; Warchol, 2010) support the hypothesis that generation of reactive oxygen species in the HC mitochondria is the key event that precipitates apoptosis. In the case of the antibiotics, the formation of iron-aminoglycoside complexes which are redox-active seems to be the main factor contributing to the oxidative stress, although enzymatic pathways may also participate. The way by which cisplatin generates reactive oxygen species is less clear but may involve their generation by NOX3 (a superoxide-generating isoform of NADPH oxidase) and by xanthine oxidase. For both cisplatin and aminoglycosides, apoptosis depends on activation of the effector caspase-3 preceded by activation of the upstream caspase-9. One major link between oxidative stress and caspase activation that has been identified in the aminoglycoside studies is the c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway. For cisplatin, it has been suggested that JNK activation participates in HC repair rather than HC death, while activation of the p53 tumor suppressor has been identified as a major upstream pathway for caspase activation. Nevertheless, multiple signaling pathways for apoptosis may activate simultaneously.

Molecular evidence of a role of apoptosis in ototoxic HC loss *in vivo* is also abundant, but the emerging picture is a complex one, and it is quite clear that the modes of HC demise may vary from one exposure model to another, and that they may include non-apoptotic modes. That HC apoptosis occurs in both the cochlea and the vestibular epithelia during ototoxic damage was indicated early on by biochemical evidence, such as DNA fragmentation (Lenoir et al., 1999; Nakagawa et al., 1997; Seoane et al., 2001a; Usami et al., 1997). As found *in vitro*, several different pathways have been identified in *in vivo* studies. For instance, in chinchilla, activation of the initiator caspase-9 has been identified as a mediator of the ototoxicity caused by co-exposure to gentamicin and ethacrynic acid (Ding et al., 2010) while activation of the initiator caspase-8 has been identified instead for the cisplatin/ethacrynic acid combination (Ding et al., 2007). However, caspase-independent pathways of HC cell death have been found to predominate in other models. Thus, following kanamycin administration, mouse auditory hair cells showed EndoG translocation and activation of μ -calpain and cathepsin D, but no markers for classic apoptotic pathways (cytochrome c, caspase-9, caspase-3, JNK and TUNEL) (Jiang et al., 2006). In that study, ultrastructural features of HC necrosis were observed along with apoptotic HC figures; the results suggest that chronic aminoglycoside treatment may trigger multiple cell death pathways, including those leading to necrosis (Jiang et al., 2006). This would be in contrast to the predominant role of apoptosis found *in vitro* and in acute models (see above).

From the data reviewed in the previous paragraph, one may be tempted to conclude that HC apoptosis is associated with acute modes of ototoxicity while necrosis predominates in more chronic models. However, this hypothesis is not supported by the data obtained using the 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) model in the rat vestibular system (Seoane et al., 2001a). In that model, necrosis predominates according to ultrastructural criteria after high acute

doses, while apoptosis predominates following more progressive repeated exposure. This observation is in agreement with data from the field of neuronal degeneration, which show necrosis at high intensities of damaging stimuli that cause apoptosis at lower intensities (Nicotera et al., 1999). One factor that may be involved in the differential response of HCs to ototoxic chemicals is their pharmacokinetics. It is well known that aminoglycosides readily enter HCs and then undergo biphasic clearance with a second half-life of longer than 30 days (Schacht et al., 2012). This probably accounts for the progression of ototoxicity events even long after the end of the exposure period. It could also facilitate higher HC concentrations being reached following chronic dosing, which in turn may condition the cell death pathways being activated. In the cochlea, the interaction with noise may also be a conditioning factor (Li and Steyger, 2009).

5. HC extrusion in ototoxic damage

In epithelia, cell demise can proceed by extrusion of the cell from the luminal surface. The best-known example is the extrusion of cells from the intestinal mucosa, which is part of the continuous renewal of this epithelium. The extrusion of cells in the apical parts of the villi balances the generation of new epithelial cells in the deep parts of the intestinal crypts (Stappenbeck et al., 1998). Although there are data indicating that HCs extrusion can occur in the mammalian cochlea (Seoane and Llorens, 2005; Whitworth et al., 1999), this phenomenon is not well-documented in this epithelium and the common finding is apoptotic intraepithelial degeneration (Forge, 1985). In contrast, there is no doubt that extrusion operates in the mammalian vestibular epithelia and in the auditory and vestibular epithelia of non-mammalian vertebrates following ototoxic exposure. In one of the first studies that specifically addressed this question, two patterns of HC demise were identified by scanning and transmission electron microscopy in the vestibular sensory epithelia of guinea pigs exposed to gentamicin (Li et al., 1995). These were apoptosis of HCs within the sensory epithelia and extrusion of apparently live cells toward the endolymphatic cavity. Evidence of this form of HC demise was already available in mammals (e.g., Wörsall et al., 1973) and had long been recognized as the main form of HC loss in non-mammalian vertebrates following a variety of insults (Corwin et al., 1991; Cotanche, 1987). In some particular intoxication models, HC extrusion is the only observed form of cell demise in the mammalian vestibular epithelia (Seoane et al., 2001a,b). Despite this prominent occurrence of HC extrusion, its physiological significance and the molecular mechanisms involved remain insufficiently characterized. One widely accepted hypothesis is that HC extrusion and apoptosis both allow the preservation of tissue integrity by minimizing damage and inflammation in the local environment (Hirose et al., 2004; Hordichok and Steyger, 2007; Li et al., 1995; Mangiardi et al., 2004; Seoane et al., 2001a). One less clear aspect is the relationship with the intoxication rate. It is well known that many toxic compounds may cause cell necrosis or apoptosis depending on the concentrations, with necrosis observed at higher concentrations (Ankarcrona et al., 1995; Bonfoco et al., 1995; Gwag et al., 1999; Nicotera et al., 1999). In a comparison of acute, sub-acute and sub-chronic exposure to IDPN, Seoane et al. (2001a) observed that necrosis predominated following acute high-dose exposure, while apoptosis predominated following sub-acute exposure, and sub-chronic low-dose exposure caused extrusion of most HCs. It was concluded that the predominant mode of HC demise depends on the intensity of the damaging stimulus and that extrusion is the predominant form associated with the low intensity, persistent insult caused by chronic low-dose ototoxic exposure. Thus, extrusion would be a finely controlled way of eliminating damaged HCs, and would be

caused by the more progressive forms of HC damage. Although there is no independent confirmation of these statements, some data support the conclusion that HC extrusion is a major factor in chronic ototoxicity (Granados and Meza, 2005), in contrast to acute ototoxicity (Llorens and Demêmes, 1994).

The relationship between HC apoptosis and extrusion remains to be better understood. In the auditory system of chicks exposed to gentamicin, Mangiardi et al. (2004) found expression of molecular markers of apoptosis, including activated caspase-3, in the extruding HCs. The observation that extruding cells undergo apoptosis at the same time had been reported in the intestinal epithelia (Rosenblatt et al., 2001). However, no evident ultrastructural or biochemical signs of apoptosis were observed in the extruding mammalian vestibular HCs (Li et al., 1995; Seoane et al., 2001a). Interestingly, live cell extrusion, rather than apoptotic cell extrusion, has recently been characterized as a major mechanism operating in a number of mammalian and non-mammalian epithelia to maintain cell numbers (Eisenhoffer et al., 2012). To our knowledge, the molecular events triggering HC extrusion in ototoxically damaged mammalian vestibular epithelia have not been studied.

6. Ganglion cells and afferent terminals in ototoxic damage

Although there is ample consensus that ototoxic compounds are defined by their toxicity upon the HCs, it is also well known that afferent dendrite terminals and the corresponding ganglion neurons may also be damaged (Dau and Wenthold, 1989; Koitchev et al., 1982; Ylikoski et al., 1974). In fact, several reports have found that the terminals are damaged before the HCs. These include studies of human auditory systems that apparently show primary loss of auditory neurons following ototoxic exposure (Hinojosa and Lerner, 1987; Sone et al., 1998). These results differ from the more common finding of auditory HC degeneration preceding neuronal degeneration, which is usually interpreted as secondary degeneration of the ganglion neurons due to loss of trophic support after the HC degeneration that would be the primary ototoxic event (e.g. Ernfors et al., 1996; reviewed by Schacht et al., 2012). In animal studies, the common view of primary HC loss followed by secondary neuronal degeneration (Ladrech et al., 2004; Schacht et al., 2012) is nevertheless accompanied by evidence that direct damage to the terminals may also occur (e.g. Ruan et al., *in press*). Little data is available on the molecular mechanism involved in spiral ganglion neuron degeneration, but calpain and protein kinase C activation have been reported to occur and may have damage-mediating and protective roles, respectively (Ladrech et al., 2004). In both the auditory and vestibular ganglia, aminoglycosides increased the expression of transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) and of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3, and this was interpreted as activation of defense mechanisms against the ototoxic insult (Kitahara et al., 2005a,b).

In the vestibular system, a decrease in the number of vestibular ganglion neurons has been recorded in specimens from humans affected by aminoglycoside ototoxicity (Ishiyama et al., 2005). According to the authors, the findings were compatible both with a secondary consequence of HC loss and with a direct toxic effect of the antibiotics on the vestibular neurons. In animal studies, vestibular ganglion neurons have been found to survive longer than spiral ganglion neurons after HC loss (Dupont et al., 1993; Jensen, 1983), but available data also support the hypothesis that ototoxic compounds may have a direct toxic effect on the ganglion neurons in addition to their HC effect (Sera et al., 1987). One particular view is offered by studies with IDPN in the rat, as this ototoxic compound offers unique flexibility in dosing regimes.

Following acute high-dose exposure, exquisite preservation of the vestibular afferent terminals was observed at short times after exposure when the HCs were degenerating through necrotic and apoptotic patterns (Llorens and Demêmes, 1994). In contrast, in the chronic IDPN model that predominantly causes HC extrusion (Seoane et al., 2001a), the initial evidence for HCl extrusion was preceded by calyx afferent detachment, and this was followed by retraction and fragmentation of the calyces (Seoane et al., 2001b). The known effects of IDPN on neurofilaments (Chou and Hartmann, 1964; Griffin et al., 1978; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997), leading to loss of NF in the vestibular afferents (Seoane et al., 2003) as in the motor endplates (Soler-Martín et al., 2012), may have a role in the pathology of the afferents after chronic exposure (Seoane et al., 2003). However, this may be a common response to chronic ototoxicity.

As indicated above, the HC synapses on the ganglion neurons are glutamatergic, so these neurons are exposed to excitotoxicity. This has been investigated through trans-tympanic injection of glutamate agonists, which results in acute excitotoxic damage to the cochlear and vestibular afferents that in mild conditions can involve reversible swelling only (Brugeaud et al., 2007), while stronger stimuli will cause complete degeneration (Raymond et al., 1988). Acute excitotoxic damage to the afferent terminals is also a key event in ischemia-induced inner ear damage (Pujol et al., 1992), and is believed to have a major role in noise-induced auditory neuron damage (Kujawa and Liberman, 2009). In the case of reversible damage to the terminals, functional evidence indicates the temporary loss of synaptic transmission, known as “synaptic uncoupling” (Brugeaud et al., 2007; Puel et al., 1995). The occurrence of excitotoxicity in the inner ear synapses may explain the observations of primary afferent or neuronal damage by ototoxic compounds that in other experimental settings show high selectivity for the HCs. The explanatory hypothesis would be that HCs under toxic stress have a limited capacity for regulating glutamate release and reuptake, which leads to chronic excitotoxic aggression to the afferents. If this is true, slowly evolving afferent damage would be the most relevant event in the early stages of any chronic ototoxic exposure. As noted above, the synapse between calyx afferents and HClS may be particularly sensitive to deregulation of glutamate homeostasis.

7. Conclusion

Ototoxic compounds that cause HC loss in both the vestibular and auditory systems are probably quite selective for these cells, where they often activate apoptotic pathways, although they also activate other cell demise pathways, including necrosis. The ganglion neurons are also a target of this toxicity and the extent to which ganglion neuron damage is due to direct toxicity or a secondary consequence of HC loss may depend on the particular exposure model. The data available from chronic low-dose exposure models indicate that more complex patterns of HC demise and afferent neuron damage may occur, and these are scarcely understood. The effects of chronic low-dose exposure are more relevant to human populations and to the possible role of ototoxic exposure on the sensory loss observed in aging. Thus, research efforts are required to understand the physiological role and molecular mechanism of HC extrusion and the role of excitotoxic processes in chronic ototoxicity.

Conflict of interest

J.L. is a member of the Scientific Advisory Board of Sensorion Pharmaceuticals, a company that produces treatments for vestibular disorders.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, grant number BFU2012-31164), and the Generalitat de Catalonia (grant number 2009 SGR 1059).

References

- Agrawal Y, Carey JP, Della Santina CC, Schubert MC, Minor LB. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2004. *Arch Intern Med* 2009;169:938–44 [Erratum in: *Arch Intern Med* 2009; 169:1419].
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovskiy B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995;15:961–73.
- Balbuena E, Llorens J. Behavioral disturbances and sensory pathology following allylnitrite exposure in rats. *Brain Res* 2001;904:298–306.
- Bauer CA, Brozoski TJ. Cochlear structure and function after round window application of ototoxins. *Hear Res* 2005;201:121–31.
- Black FO, Gianna-Poulin C, Pesznecker SC. Recovery from vestibular ototoxicity. *Otol Neurotol* 2001;22:662–71.
- Black FO, Pesznecker S, Stallings V. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otol Neurotol* 2004;25:559–69.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7162–6.
- Brugéaud A, Travo C, Demêmes D, Lenoir M, Llorens J, Puel JL, et al. Control of hair cell excitability by vestibular primary sensory neurons. *J Neurosci* 2007;27:3503–11.
- Campo P, Morata TC, Hong OS. Chemical exposure and hearing loss. *Disease-a-month* 2013;59:119–38.
- Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Roldán A, Jorge E, García-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269:2455–9.
- Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:343–8.
- Chiu LL, Cunningham LL, Raible DW, Rubel EW, Ou HC. Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9:178–90.
- Chou SM, Hartmann HA. Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. With a concept – ‘axostasis’. *Acta Neuropathol* 1964;3:428–50.
- Corwin JT, Jones JE, Katayama A, Kelley MW, Warchol ME. Hair cell regeneration: the identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues. *Ciba Found Symp* 1991;160:103–20.
- Cunningham LL. The adult mouse utricle as an in vitro preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain Res* 2006;1091:277–81.
- Cotanche DA. Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear Res* 1987;30:181–95.
- Dalet A, Bonsacquet J, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chidavaenzi RL, Venteo S, et al. Glutamate transporters EAAT4 and EAAT5 are expressed in vestibular hair cells and calyx endings. *PLoS One* 2012;7:e46261.
- Dau J, Wenthold RJ. Immunocytochemical localization of neurofilament subunits in the spiral ganglion of normal and neomycin-treated guinea pigs. *Hear Res* 1989;42:253–64.
- Ding D, Jiang H, Wang P, Salvi R. Cell death after co-administration of cisplatin and ethacrynic acid. *Hear Res* 2007;226:129–39.
- Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid. *Hear Res* 2010;259:16–23.
- Dupont J, Guilhaume A, Aran JM. Neuronal degeneration of primary cochlear and vestibular innervations after local injection of sisomicin in the guinea pig. *Hear Res* 1993;68:217–28.
- Eisenhoffer GT, Loftus PD, Yoshigi M, Otsuna H, Chien CB, Morcos PA, et al. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* 2012;484:546–9.
- Erfors P, Duan ML, ElShamy WM, Canlon B. Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat Med* 1996;2:463–7.
- Fechter LD, Liu Y, Herr DW, Crofton KM. Trichloroethylene ototoxicity: evidence for a cochlear origin. *Toxicol Sci* 1998;42:28–35.
- Forge A. Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear Res* 1985;19:171–82.
- Forge A, Li L. Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear Res* 2000;139:97–115.
- Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol* 2000;5:3–22.
- Granados O, Meza C. Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin in vivo, is vestibulotoxic in rats. *Histol Histopathol* 2005;20:357–64.
- Griffin JW, Hoffman PN, Clark AW, Carrol PT, Price DL. Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment by 3,3'-iminodipropionitrile administration. *Science* 1978;202:633–5.
- Groves AK. The challenge of hair cell regeneration. *Exp Biol Med* 2010;235:434–46.
- Guthrie OW. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 2008;249:91–6.
- Gwag BJ, Canzoniero LMT, Sensi SL, Demaro JA, Koh JY, Goldberg MP, et al. Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience* 1999;90:1339–48.
- Heydt JL, Cunningham LL, Rubel EW, Coltrera MD. Round window gentamicin application: an inner ear hair cell damage protocol for the mouse. *Hear Res* 2004;192:65–74.
- Hinojosa R, Lerner SA. Cochlear neural degeneration without hair cell loss in two patients with aminoglycoside ototoxicity. *J Infect Dis* 1987;156:449–55.
- Hirose K, Lesnick E, Westrum LE, Cunningham DE, Rubel EW. Electron microscopy of degenerative changes in the chick basilar papilla after gentamicin exposure. *J Comp Neurol* 2004;470:164–80.
- Hoet P, Lison D. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit Rev Toxicol* 2008;38(2):127–70.
- Hordichok AJ, Steyger PS. Closure of supporting cell scar formations requires dynamic actin mechanisms. *Hear Res* 2007;232:1–19.
- Ishiyama G. Imbalance and vertigo: the aging human vestibular periphery. *Semin Neurol* 2009;29:491–9.
- Ishiyama G, Finn M, Lopez I, Tang Y, Baloh RW, Ishiyama A. Unbiased quantification of Scarpa's ganglion neurons in aminoglycoside ototoxicity. *J Vestib Res* 2005;15:197–202.
- Jensen DW. Survival of function in the deafferented vestibular nerve. *Brain Res* 1983;273:175–8.
- Jiang H, Sha SH, Forge A, Schacht J. Caspase-independent pathways of hair cell death induced by kanamycin in vivo. *Cell Death Differ* 2006;13:20–30.
- Kitahara T, Li HS, Balaban CD. Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. *Hear Res* 2005a;201:132–44.
- Kitahara T, Li-Korotky HS, Balaban CD. Regulation of mitochondrial uncoupling proteins in mouse inner ear ganglion cells in response to systemic kanamycin challenge. *Neuroscience* 2005b;135:639–53.
- Koitchev K, Guilhaume A, Cazals Y, Aran JM. Spiral ganglion changes after massive aminoglycoside treatment in the guinea pig. Counts and ultrastructure. *Acta Otolaryngol* 1982;94:431–8.
- Kotecha B, Richardson GP. Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear Res* 1994;73:173–84.
- Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 2009;29:14077–85.
- Ladrech S, Guignon M, Saido T, Lenoir M. Calpain activity in the amikacin-damaged rat cochlea. *J Comp Neurol* 2004;477:149–60.
- Lenoir M, Daudet N, Humbert G, Renard N, Gallego M, Pujol R, et al. Morphological and molecular changes in the inner hair cell region of the rat cochlea after amikacin treatment. *J Neurocytol* 1999;28:925–37.
- Leonova EV, Raphael Y. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxicity damaged organ of Corti. *Hear Res* 1997;113:14–28.
- Li Y, Ding D, Jiang H, Fu Y, Salvi R. Co-administration of cisplatin and furosemide causes rapid and massive loss of cochlear hair cells in mice. *Neurotox Res* 2011;20:307–19.
- Li L, Nevill G, Forge A. Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J Comp Neurol* 1995;355:405–17.
- Li H, Steyger PS. Synergistic ototoxicity due to noise exposure and aminoglycoside antibiotics. *Noise Health* 2009;11:26–32.
- Llorens J, Demêmes D. Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia. *Hear Res* 1994;76:78–86.
- Llorens J, Rodríguez-Farré E. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19:117–27.
- Llorens J, Demêmes D, Sans A. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;123:199–210.
- Lyford-Pike S, Vogelheim C, Chu E, Della Santina CC, Carey JP. Gentamicin is primarily localized in vestibular type I hair cells after intratympanic administration. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8:497–508.
- Lysakowski A, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chatlani S, Price SD, Eatock RA. Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *J Neurosci* 2011;31:10101–14.
- Mangiardi DA, McLaughlin-Williamson K, May KE, Messana EP, Mountain DC, Cotanche DA. Progression of hair cell ejection and molecular markers of apoptosis in the avian cochlea following gentamicin treatment. *J Comp Neurol* 2004;475:1–18.
- Matsui JJ, Gale JE, Warchol ME. Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J Neurobiol* 2004;61(2):250–66.
- McFadden SL, Ding D, Jiang H, Woo JM, Salvi RJ. Chinchilla models of selective cochlear hair cell loss. *Hear Res* 2002;174:230–8.
- Murillo-Cuesta S, García-Alcántara F, Vacas E, Sistiaga JA, Camarero G, Varela-Nieto I, et al. Direct drug application to the round window: a comparative study of ototoxicity in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:584–90.
- Murillo-Cuesta S, Contreras J, Cediell R, Varela-Nieto I. Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Lab Anim* 2010;44:124–31.
- Nakagawa T, Yamane H, Shibata S, Nakai Y. Gentamicin ototoxicity induced apoptosis of the vestibular hair cells of guinea pigs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254:9–14.
- Nicotera P, Leist M, Manzo L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trend Pharmacol Sci* 1999;20:46–51.
- Oesterle EC, Campbell S, Taylor RR, Forge A, Hume CR. Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9:65–89.

- Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hear Res* 2011;281:18–27.
- Perrine H, Dominique L. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:127–70.
- Pouyatos B, Campo P, Lataye R. Use of DPOAEs for assessing hearing loss caused by styrene in the rat. *Hear Res* 2002;165:156–64.
- Pujol R, Puel JL, Eybalin M. Implication of non-NMDA and NMDA receptors in cochlear ischemia. *Neuroreport* 1992;3:299–302.
- Puel JL, Saffiedine S, Gervais d'Aldin C, Eybalin M, Pujol R. Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III* 1995;318:67–75.
- Raymond J, Dememes D, Nieouillon A. Neurotransmitters in vestibular pathways. *Prog Brain Res* 1988;76:29–43.
- Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbours to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* 2001;11:1847–57.
- Ruan Q, Ao H, He J, Yu Z, Zhang R, Wang J, et al. Topographic and quantitative evaluation of gentamycin-induced damage to the peripheral innervation of mouse cochlea. *Neurotoxicology* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.002> (in press).
- Rubel EW, Furrer SA, Stone JS. A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear Res* 2013;297:42–51.
- Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15:364–9.
- Rybak LP, Whitworth CA. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today* 2005;10:1313–21.
- Saldaña-Ruiz S, Hernández-Mir G, Sedó-Cabezón L, Cutillas B, Llorens J. Vestibular toxicity of cis-2-pentenenitrile in the rat. *Toxicol Lett* 2012;211:281–8.
- Saldaña-Ruiz S, Boadas-Vaello P, Sedó-Cabezón L, Llorens J. Reduced systemic toxicity and preserved vestibular toxicity following co-treatment with nitriles and CYP2E1 inhibitors: a mouse model for hair cell loss. *J Assoc Res Otolaryngol* 2013;14:661–71.
- Schacht J, Talaska AE, Rybak LP. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec* 2012;295:1837–50.
- Sciarretta C, Fritsch B, Beisel K, Rocha-Sanchez SM, Buniello A, Horn JM, et al. PLC γ -activated signalling is essential for TrkB mediated sensory neuron structural plasticity. *BMC Dev Biol* 2010;10:103.
- Seoane A, Demêmes D, Llorens J. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *J Comp Neurol* 2001a;439:385–99.
- Seoane A, Demêmes D, Llorens J. Pathology of the rat vestibular sensory epithelia during subchronic 3,3'-iminodipropionitrile exposure: hair cells may not be the primary target of toxicity. *Acta Neuropathol* 2001b;102:339–48.
- Seoane A, Demêmes D, Llorens J. Distal effects in a model of proximal axonopathy: 3,3'-iminodipropionitrile causes specific loss of neurofilaments in rat vestibular afferent endings. *Acta Neuropathol* 2003;106:458–70.
- Seoane A, Llorens J. Extruding auditory hair cells in rats exposed to subchronic 3,3'-iminodipropionitrile. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;19:571–4.
- Sera K, Harada Y, Tagashira N, Suzuki M, Hirakawa K, Ohya T. Morphological changes in the vestibular epithelia and ganglion induced by ototoxic drug. *Scanning Microsc* 1987;1:1191–7.
- Soler-Martín C, Díez-Padrisa N, Boadas-Vaello P, Llorens J. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs and frogs. *Toxicol Sci* 2007;96:123–32.
- Soler-Martín C, Vilarrosa U, Saldaña-Ruiz S, García N, Llorens J. Loss of neurofilaments in the neuromuscular junction in a rat model of proximal axonopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012;38:61–71.
- Sone M, Schachern PA, Paparella MM. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hear Res* 1998;115:217–23.
- Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JL. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:702–9.
- Takumi Y, Matsubara A, Danbolt NC, Laake JH, Storm-Mathisen J, Usami S, et al. Discrete cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and the glutamate transporter GLAST in the rat vestibular end organ. *Neuroscience* 1997;79:1137–44.
- Taylor RR, Nevill G, Forge A. Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9:44–64.
- Usami S-I, Takumi Y, Fujita S, Shinkawa H, Hosokawa M. Cell death in the inner ear associated with aging is apoptosis? *Brain Res* 1997;747:147–50.
- Vago P, Humbert G, Lenoir M. Amikacin intoxication induces apoptosis and cell proliferation in rat organ of Corti. *Neuroreport* 1998;9:431–6.
- Warchol ME. Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;18:454–8.
- Wersäll J, Björkroth B, Flock A, Lundquist PG. Experiments on ototoxic effects of antibiotics. *Adv Otorhinolaryngol* 1973;20:14–41.
- Whitworth CA, Hudson TE, Rybak LP. The effect of combined administration of cadmium and furosemide on auditory function in the rat. *Hear Res* 1999;129:61–70.
- Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear Res* 2001;158(1–2):165–78.
- Xie J, Talaska AE, Schacht J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res* 2011;281:28–37.
- Ylikoski J, Wersäll J, Björkroth B. Degeneration of neural elements in the cochlea of the guinea-pig after damage to the organ of Corti by ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl* 1974;326:23–41.
- Yorgason JG, Fayad JN, Kalinec F. Understanding drug ototoxicity: molecular insights for prevention and clinical management. *Expert Opin Drug Saf* 2006;5:383–99.
- Yorgason JG, Luxford W, Kalinec F. In vitro and in vivo models of drug ototoxicity: studying the mechanisms of a clinical problem. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7:1521–34.