



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Evaluación funcional y daño progresivo en el sistema vestibular

Alberto Maroto Ferrer



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Evaluación funcional y daño progresivo en el sistema vestibular

Doctorando:

Alberto Maroto Ferrer

Director y tutor de la tesis:

Dr. Jordi Llorens Baucells

Departamento de Ciencias Fisiológicas
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Campus de Bellvitge – Universitat de Barcelona - 2021

Esta tesis ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- **BFU2015-66109-R** (MINECO/FEDER, EU).
- **RTI2018-096452-B-I00** (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, MCIU/AEI/FEDER, UE).
- **2017 SGR 621** (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya).

AGRADECIMIENTOS

El hecho de haber realizado esta tesis ha supuesto para mí la culminación de un sueño hecho realidad. Aunque no ha sido fácil ni el camino previo ni durante el transcurso de esta, creo que he crecido mucho a nivel personal y estoy muy agradecido de haber llegado hasta aquí.

Hay muchas personas que han contribuido a su realización, pero sin duda, la más importante de ellas es mi tutor y director de tesis Jordi Llorens. Quiero agradecerle haber apostado por mí, brindándome la confianza, la motivación y el apoyo que necesitaba en todo momento. Nuestro camino en busca de financiación no ha sido siempre sencillo, pero he tenido en todo momento el respaldo de alguien que cree en ti y que busca tus mejores condiciones dentro de las posibilidades del momento. Además, su enorme experiencia en el campo y al mismo tiempo la flexibilidad que me daba para organizar mis experimentos nos ha servido para superar gran parte de los objetivos que nos planteamos inicialmente.

En segundo lugar, quisiera tener unas palabras para Marta Giralt. En su laboratorio inicié mi carrera investigadora y mi estancia allí me aportó toda la confianza necesaria para seguir mi camino en el mundo de la investigación.

Una de las principales técnicas experimentales de esta tesis es la microscopía confocal. Quiero agradecer a Benjamín Torrejón, técnico de microscopía del CCiTUB de Bellvitge, por la ayuda, confianza e independencia que me ha dado en el uso de los equipos. Gracias a ello he aprendido a disfrutar del arte de la microscopía a la vez que mejoraba y maximizaba los resultados obtenidos.

En nuestro laboratorio han pasado multitud de estudiantes cargados de energía e ilusión que han aportado su granito de arena a las investigaciones, y a su vez, han contribuido a que el ambiente laboral fuera mucho más distendido y agradable.

Esta tesis se ha realizado en un departamento en el que existe una muy buena relación entre grupos. A lo largo del tiempo, algunos de mis compañeros se han convertido en grandes amigos y les estoy muy agradecido por el tiempo que hemos pasado juntos.

Durante el transcurso experimental ha sido necesaria la utilización de multitud de animales que, con su sacrificio han contribuido a la elaboración de gran parte de los resultados presentados. Siempre se ha intentado minimizar su uso, sufrimiento y a su vez aprovechar al máximo los resultados que han dado cada uno de ellos.

Por último, me gustaría acabar agradeciendo a las personas más importantes en mi vida, mi familia y mi esposa, por todo lo que me han dado. Gran parte de lo que soy se lo debo a ellos y, en consecuencia, este logro también es suyo.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	5
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Generalidades y anatomía del sistema vestibular	11
3.1.1. Equilibrio y sistema vestibular	11
3.1.2. El oído interno.....	11
3.1.3. La cóclea, centro transductor de la audición.....	12
3.1.4. El sistema vestibular, componentes principales que lo Integran	13
3.2. Las células ciliadas y su sistema aferente	13
3.2.1. Características de las células ciliadas	13
3.2.2. Despolarización y transducción de señales	14
3.2.3. Tipos de células ciliadas	15
3.2.4. Las células de soporte	16
3.2.5. El sistema aferente.....	16
3.3. Componentes del sistema vestibular	17
3.3.1. Los órganos otolíticos	17
3.3.2. Los canales semicirculares	19
3.4. Las uniones caliciales.....	21
3.4.1. Características de la unión	21
3.4.2. Caspr1	22
3.4.3. Contactina-1.....	22
3.4.4. Tenascina-C.....	23
3.4.5. KCNQ4.....	24
3.4.6. Sinapsis en cinta.....	24
3.4.7. Ribeye	25
3.4.8. PSD-95.....	25
3.5. La capacidad regenerativa del sistema vestibular	26
3.5.1. Regeneración de las células ciliadas.....	26
3.5.2. <i>Atoh1</i>	27
3.5.3. La vía Notch.....	27

3.5.4. La vía WNT	27
3.6. Alteración funcional del sistema vestibular	29
3.6.1. Disfunción vestibular.....	29
3.6.2. Anomalías del sistema vestibular en humanos	29
3.6.3. Ototoxicidad.....	30
3.6.4. Modelos animales basados en la ototoxicidad.....	30
3.6.5. Modelos animales en rata y ratón	31
3.6.6. Generalidades de los nitrilos.....	31
3.6.7. Ototoxicidad de los nitrilos	32
3.7. El IDPN (3,3'-iminodipropionitrilo)	32
3.7.1. Molécula y efectos neurotóxicos	32
3.7.2. La ototoxicidad del IDPN	33
3.7.3. Limitaciones del modelo de IDPN	36
3.8. Los antibióticos aminoglucósidos.....	36
3.8.1. Origen e historia de los aminoglucósidos.....	36
3.8.2. Farmacocinética y farmacodinámica.....	37
3.8.3. Mecanismo de acción y toxicidad asociada.....	38
3.8.4. Ototoxicidad de los aminoglucósidos.....	39
3.8.5. Comportamiento de las células ciliadas ante los aminoglucósidos	40
3.8.6. Estrategias de otoprotección	41
3.8.7. Aminoglucósidos y la tuberculosis	42
3.9. Evaluación funcional del sistema vestibular.....	42
3.9.1. Evaluación vestibular en humanos.....	42
3.9.2. Evaluación vestibular en roedores	44
3.10. Limitaciones y perspectivas de futuro en la investigación del sistema vestibular	46
4. OBJETIVOS	49

5. MATERIALES Y MÉTODOS	53
5.1. Lista de productos utilizados	55
5.2. Animales	58
5.3. Disección vestibular	61
5.4. Protocolos utilizados	62
5.5. Confocal y su configuración para la visualización de las muestras.....	68
5.6. Análisis de fluorescencia.....	69
5.7. Análisis de comportamiento y grabación de video.....	71
5.8. Estadística.....	75
6. RESULTADOS	77
CAPÍTULO I: RELACIÓN ENTRE LA PÉRDIDA DE CÉLULAS CILIADAS Y LA ALTERACIÓN DE DOS REFLEJOS ANTI GRAVITACIONALES EN RATA....	79
6.1.1. Efectos del IDPN en el reflejo anti gravitacional tail-lift.....	79
6.1.2. Efectos del IDPN en los tiempos del reflejo air-right.....	81
6.1.3. Estudio conjunto y relación de ambos reflejos	82
6.1.4. Pérdida de células ciliadas dependiente de la dosis, zona epitelial y tipo celular después de la exposición a IDPN.....	83
6.1.5. Recuento adicional en el segundo hemisferio con Tenascina, calretinina, Myo7a y Oncomodulina	89
6.1.6. Relación entre la pérdida de células ciliadas y los reflejos anti gravitacionales	93
6.1.7. Análisis de las sinapsis en las células ciliadas de tipo II	107
CAPÍTULO II: EFECTO DE LA TOXICIDAD CRÓNICA POR ESTREPTOMICINA EN EL SISTEMA VESTIBULAR EN RATA.....	108
CAPÍTULO IIA MODELO DE ESTREPTOMICINA DE UNA INYECCIÓN DIARIA.....	108
6.2a.1. Efecto de la exposición diaria a estreptomicina durante seis semanas en el peso corporal	108
6.2a.2. Efecto de la exposición diaria a estreptomicina durante seis semanas en la función vestibular	109

6.2a.3. Efecto de la exposición diaria a estreptomina durante ocho semanas en el peso corporal	110
6.2a.4. Efecto de la exposición a estreptomina durante ocho semanas en la función vestibular	111
6.2a.5. Análisis de la recuperación tras seis semanas de tratamiento	112
6.2a.6. Análisis de la recuperación tras ocho semanas de tratamiento	114
6.2a.7. Ultraestructura de los epitelios vestibulares: TEM y SEM	116
6.2a.8. Efecto de la estreptomina sobre el número de células ciliadas.....	119
6.2a.9. Efecto de la estreptomina en las uniones caliciales y análisis de Caspr1	121
6.2a.10. Análisis de Myo7a	123
6.2a.11. Efecto de la estreptomina sobre KCNQ4	124
6.2a.12. Análisis molecular del desacoplamiento sináptico tras el tratamiento con estreptomina.....	126

CAPÍTULO IIB MODELO DE ESTREPTOMICINA DE DOS INYECCIONES DIARIAS..... 128

6.2b.1. Efecto de dos administraciones diarias de estreptomina en el peso corporal	128
6.2b.2. Efecto de dos administraciones diarias de estreptomina en la función vestibular	130
6.2b.3. Recuperación funcional de los grupos de 350 y 400mg/kg.....	131
6.2b.4. Efecto de las dos dosis diarias sobre el número de células ciliadas	132
6.2b.5. Análisis de Caspr1 y Spp1 en el modelo de dos inyecciones diarias.....	134
6.2b.6. Estudio de la extrusión por microscopía confocal.....	138
6.2b.7. Estudio de la extrusión por ultraestructura	139

CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LAS UNIONES CALICIALES EN MUESTRAS DE PACIENTES CON SCHWANNOMA VESTIBULAR 141

6.3.1. Fragmentación calicial en pacientes con schwannoma vestibular.....	141
---	-----

CAPÍTULO IV: ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE LOS MODELOS DE IDPN Y ESTREPTOMICINA EN EPITELIO 142

6.4.1. Objetivo principal.....	142
6.4.2. Estudio de RNA-seq en ratones expuestos a IDPN....	143
6.4.3. Preparación del estudio de RNA-seq en ratas expuestas a IDPN	143
6.4.4. Efecto del IDPN en el transcriptoma del epitelio vestibular de rata.....	144
6.4.5. Efecto de la estreptomicina en el transcriptoma del epitelio vestibular de rata	147
6.4.6. Estudio comparativo de los tres modelos en epitelio.....	149
6.4.7. Análisis por inmunohistoquímica de <i>Spp1</i> y <i>Ocm2</i> , dos genes diferencialment expresados en los tres modelos.....	149
6.4.8. Análisis de las proteínas <i>Spp1</i> , <i>Myo7a</i> y calretinina en el modelo de IDPN en rata	152

CAPÍTULO V: ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE LOS MODELOS DE IDPN Y ESTREPTOMICINA EN GANGLIO 152

6.5.1. Objetivo principal.....	152
6.5.2. Estudio de RNA-seq en ganglio de ratones expuestos a IDPN.....	152
6.5.3. Estudio de RNA-seq en ganglio de ratas expuestos a IDPN	153
6.5.4. Estudio del efecto de la estreptomicina en el transcriptoma del ganglio vestibular en ratas mediante un análisis de RNA-seq.....	156
6.5.5. Estudio comparativo de los tres modelos en ganglio.....	158
6.5.6. Efecto de la estreptomicina en las proteínas calretinina, NF200 y FGF12 en ganglio	158
6.5.7. Efecto de la exposición por IDPN en <i>Spp1</i> y FGF12 en ganglio	160

6.5.8. Restablecimiento de la expresión génica de <i>Spp1</i> , <i>Etv5</i> , <i>Camk1g</i> , <i>Slc17a6</i> y <i>Nptx2</i> en ganglio en ratones tratados con IDPN a los que se les ha interrumpió el tratamiento	161
6.5.9. Estudio de la expresión génica de <i>Spp1</i> , <i>Etv5</i> , <i>Camk1g</i> , <i>Slc17a6</i> y <i>Nptx2</i> en ganglio de ratón con una pérdida completa de células ciliadas	162
7. DISCUSIÓN	165
8. CONCLUSIONES	181
9. BIBLIOGRAFÍA	185
10. PUBLICACIONES	215

ABREVIATURAS

129S1: Cepa de ratón 129S1/SvImJ.

C: Cáliz.

Caspr1: Contactin-associated protein 1.

Camk1g: Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IG.

CC: Célula ciliada.

CtBP2: C-terminal-binding protein 2.

cVEMP: Potencial evocado miogénico cervical.

EAAT1: Excitatory amino acid transporter 1.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

Etv5: ETS Variant Transcription Factor 5.

DAMPs: Patrones asociados al daño.

DE: Gen diferencialmente expresado.

FGF: Fibroblast growth factor.

Gapdh: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.

HCS: Células ciliadas.

HCI: célula ciliada de tipo I.

HCII: célula ciliada de tipo II.

HIT: Head Impulse Test.

IDPN: 3,3'-iminodipropionitrilo.

Ip: Intraperitoneal.

ISGs: Interferon-Stimulated Genes.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

KCNQ4: Canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia KQT, miembro 4.

MANOVA: Análisis multivariado de la varianza.

MOWIOL: Polyvinyl alcohol 4-88.

Myo7a: Myosin VIIA.

NGS: Next-Generation Sequencing.

NF: Neurofilamento.

Nptx2: Neuronal Pentraxin 2.

NS: No significativo.

oVEMP: Potencial evocado miogénico ocular.

PBS: Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino).

PFA: Paraformaldehído.

PSD-95: Postsynaptic density-95.

RDX: Radixina.

RNA-seq: RNA sequencing.

RVO: Reflejo vestíbulo-ocular.

SC: Célula de soporte.

SE: Desviación estándar.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

Slc17a6: Solute Carrier Family 17 Member 6 (VGLUT2).

Spp1: Secreted Phosphoprotein 1.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

tRVO: Reflejo vestíbulo-ocular traslacional.

VDR: Vestibular Dysfunction Rating (puntuación de disfunción vestibular).

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

RESUMEN

Esta tesis ha establecido la relación entre la función vestibular valorada a partir de los reflejos vestibulares anti gravitacionales air-right y tail-lift con el número de células ciliadas de tipo I (HCI) y II (HCII) en los epitelios sensoriales tras lesiones ototóxicas por IDPN. Los resultados demostraron una mayor sensibilidad de las HCI en comparación con las HCII a la ototoxicidad, así como una resistencia relativa del sáculo en comparación con la cresta y el utrículo. Comparando las medidas funcionales con los recuentos de células, se observó que la pérdida del reflejo de tail-lift se asocia mejor con la población de HCI que con la de HCII. Por el contrario, la mayor parte de las HCI en la cresta y el utrículo se perdieron antes de que aumentaran los tiempos de air-right. Por lo tanto, los datos sugieren que estos reflejos dependen de la función de poblaciones no idénticas de HC vestibulares.

En esta tesis también se ha realizado el desarrollo y la caracterización de modelos de toxicidad vestibular crónica por estreptomycin en rata. En dos modelos diferentes, con una o dos inyecciones diarias de estreptomycin, se ha podido demostrar que las primeras fases de la toxicidad causada por su exposición crónica son similares a las demostradas por el tóxico experimental IDPN. Ésta se caracteriza por la pérdida de adhesión entre las células ciliadas y las terminales adyacentes, incluyendo un desacoplamiento sináptico. Además, la fase inicial se asocia al inicio de la pérdida funcional, y es reversible. También se ha demostrado en estreptomycin que, en caso del mantenimiento del estrés tóxico, se produce una pérdida de células ciliadas mediante, al menos parcialmente, por extrusión.

Por otro lado, se ha estudiado que en algunos epitelios vestibulares humanos expuestos a situación de estrés, concretamente por la presencia de un schwannoma vestibular cercano, hay también una pérdida de adhesión celular de las células ciliadas con las aferentes.

Por último, se han obtenido datos de RNA-seq para estudiar los efectos de la toxicidad crónica sobre la expresión génica en epitelios y ganglios vestibulares, comparando los diversos modelos disponibles (IDPN-rata, IDPN-ratón, estreptomycin-rata). La finalidad ha sido identificar los principales programas de expresión génica implicados en la respuesta de los tejidos vestibulares a la agresión tóxica crónica. Posteriormente, se ha recogido numerosos datos de RT-PCR y de inmunohistoquímica para corroborar e interpretar los resultados de RNA-seq.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades y anatomía del sistema vestibular

1.1 Equilibrio y sistema vestibular

El equilibrio depende de una organización sensorial compleja e implica la comunicación entre el aparato vestibular, sistema ocular, músculos posturales/tronco y corteza cerebral (Khan y Chang et al., 2013). En el caso de que la coordinación entre estas funciones sensoriales se vea alterada, se experimenta una sensación que se interpreta como vértigo.

El sistema vestibular informa de la orientación del cuerpo en el espacio y de posibles aceleraciones angulares o lineales. Los mensajes que éste envía nunca se detienen, incluso en completa inmovilidad, el sistema vestibular realiza correcciones a causa de la fuerza de la gravedad. La percepción vestibular es esencialmente inconsciente en individuos sanos, no obstante, su importancia resulta evidente en las dramáticas consecuencias que conlleva su disfunción (Bronstein et al., 2013).

El sistema vestibular responde a las aceleraciones craneales, transformándolas en señales bioeléctricas que serán transmitidas al vestibulocerebelo, una región cerebral con un papel fundamental en la ejecución y coordinación de movimientos. La información captada por el sistema vestibular se utiliza para una variedad de propósitos, incluida la estabilización de la mirada, el control motor y las funciones cognitivas.

A nivel anatómico, el oído de los mamíferos se encuentra dividido en tres partes bien diferenciadas: oído externo, medio e interno.

1.2 El oído interno

El oído interno está formado por el laberinto, una estructura membranosa ubicada en el interior del hueso temporal (Figura 11). Entre ambas estructuras se encuentra un líquido llamado perilinfa. Ésta proviene del plasma y tiene una composición iónica similar al líquido cefalorraquídeo: con una concentración alta en sodio y baja en potasio.

El interior del laberinto membranoso contiene la endolinfa, un líquido, que, al contrario de la perilinfa, es bajo en sodio y alto en potasio. La endolinfa es esencial para la transducción de los estímulos mecánicos y su composición es mantenida activamente por las células del interior de la estría vascular en la cóclea y por células oscuras en el vestíbulo (Wangemann, 2006).

En el oído interno se encuentran dos órganos con funciones muy diferenciadas: la cóclea, responsable del sentido de la audición y el laberinto vestibular, del sentido del equilibrio y propiocepción.

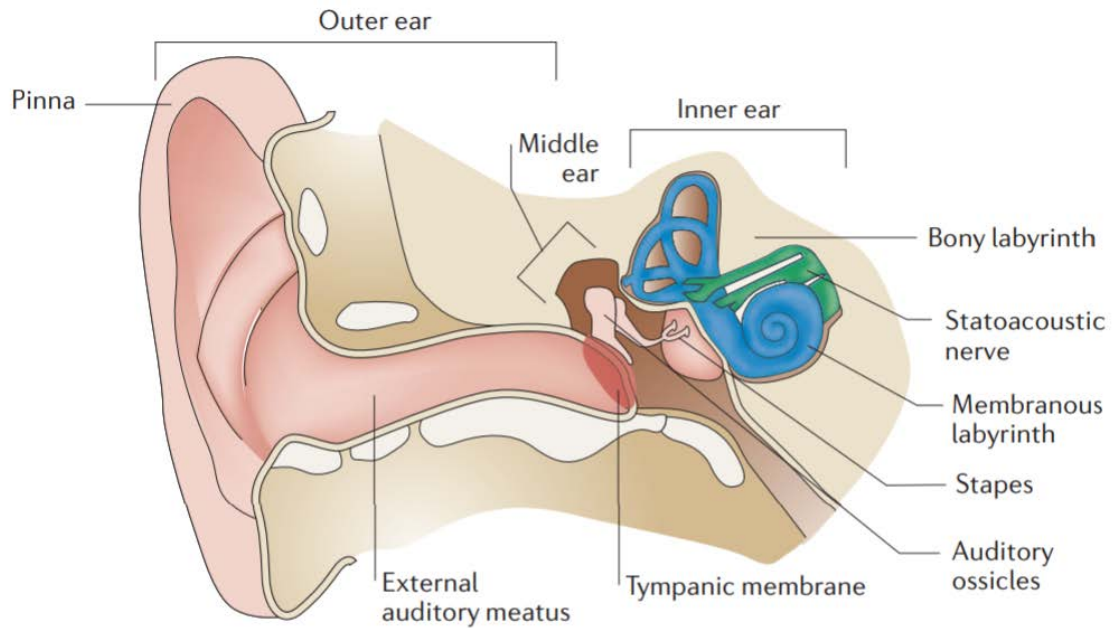


Figura 11. Esquema donde se presentan las diferentes partes anatómicas del oído, incluido el oído interno. Imagen obtenida de Kelley, 2016.

1.3 La cóclea, centro transductor de la audición

La cóclea, también denominada caracol debido a su morfología en forma espiral, contiene en su interior el Órgano de Corti. Este sistema mecanorreceptor tiene la función de transformar las vibraciones de aire (transmitidas y amplificadas por la cadena osicular del oído medio a través de la perilinfa) en señales acústicas. Esta función la realizan las células ciliadas, un tipo celular especializado en transducir las vibraciones acústicas (Figura 12).

La inervación de este órgano proviene del ganglio espiral y la unión de las terminaciones nerviosas conforman el nervio coclear. Éste se dirige al tronco encefálico por un canal óseo denominado conducto auditivo interno, que envía la información auditiva al cerebro.

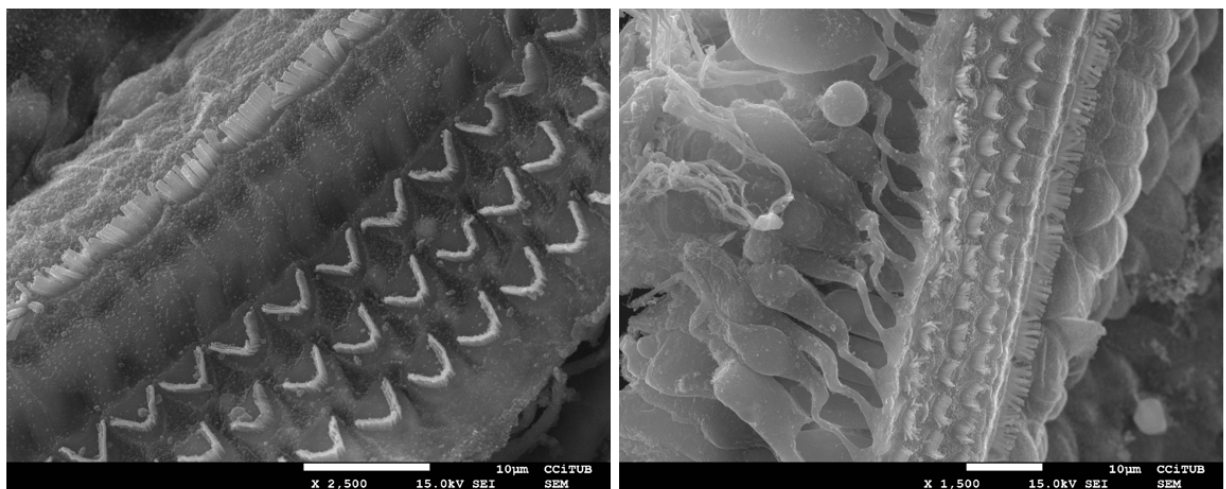


Figura 12. Imágenes propias de células ciliadas cocleares de ratona obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

1.4 El sistema vestibular, componentes principales que lo integran

El sistema vestibular permite la precisa codificación de una amplia variabilidad de estímulos gracias a la diversidad de subsistemas funcionales que lo integran. Estos se basan en diversos órganos sensoriales, tipos celulares, terminales aferentes primarios y propiedades fisiológicas de las neuronas primarias (Baird et al., 1988; Desai et al., 2005a, 2005b; Eatock y Songer, 2011; Curthoys et al., 2017; Eatock, 2018).

Al igual que la cóclea, el sistema vestibular también contiene células ciliadas, las cuales están encargadas de transmitir la información posicional a las neuronas.

A nivel anatómico está constituido por cinco órganos sensoriales con funciones diferenciadas: tres canales semicirculares, que son sensibles a las rotaciones de la cabeza y dos órganos otolíticos, que responden a aceleraciones horizontales y verticales, incluyendo a la fuerza de la gravedad (Figura 13).

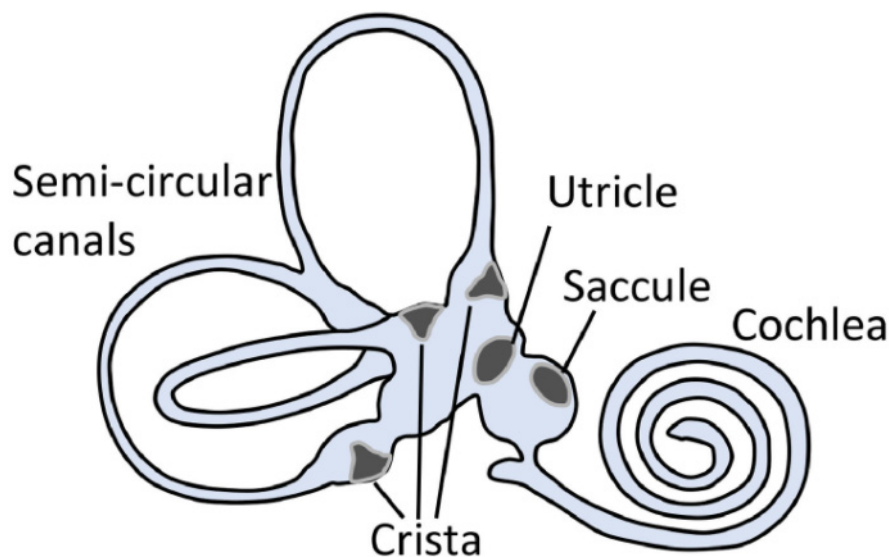


Figura 13. Esquema anatómico de los distintos componentes del sistema vestibular y la cóclea (Maroto et al., 2021).

2. Las células ciliadas y su sistema aferente

2.1 Características de las células ciliadas

Las células ciliadas son los mecanorreceptores del sistema vestibular y auditivo. Estas células son presinápticas a las terminales de las neuronas aferentes del ganglio vestibular. Su nombre hace relación a las microvellosidades que presentan en la parte apical, y que contienen la maquinaria molecular necesaria para la transducción mecanoeléctrica. Cada célula ciliada contiene entre 70 y 100 estereocilios organizados de mayor a menor tamaño (Khan y Chang, 2013).

Las células ciliadas vestibulares tienen también un único quinocilio localizado en uno de los extremos del haz de estereocilios. Éste es un auténtico cilio con el característico esqueleto de

microtúbulos (dos microtúbulos seguidos de 9 microtúbulos a su alrededor). Los estereocilios, en contraste, son proyecciones tubulares de la membrana apical de la célula ciliada que contienen filamentos de actina densamente empaquetados y que tienen un papel central en la transducción sensorial (Barrett et al., 2012).

2.2 Despolarización y transducción de señales

Los estereocilios están organizados por filas, ordenados de mayor a menor altura, de más cercano al quinocilio a más alejado respectivamente. En los estereocilios se encuentran unos filamentos diminutos con el nombre de uniones de punta (tip link), que conectan la parte superior de un estereocilio con el cuerpo del estereocilio adyacente más largo. Cuando el movimiento de la cabeza provoca la inclinación de los estereocilios en dirección al quinocilio, estas uniones se desplazan provocando la apertura mecánica de canales de transducción allí presentes (Figura 14).

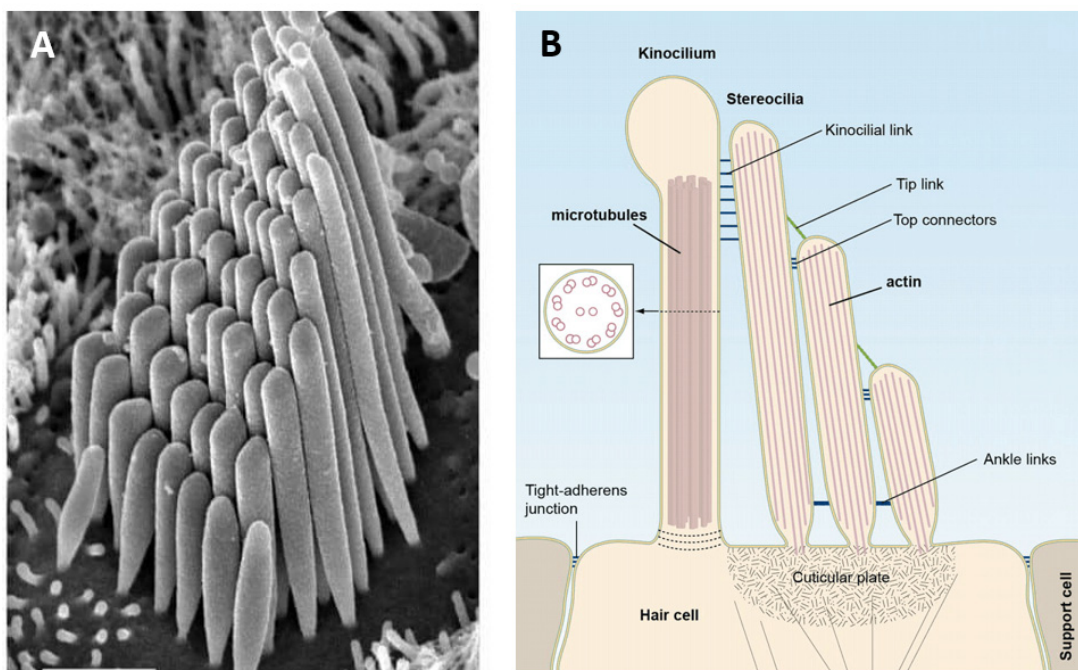


Figura 14. A: Imagen de microscopía electrónica de rastreo (SEM) donde se muestra la disposición de los estereocilios. B: Representación estructural del quinocilio con los estereocilios y las uniones en punta. Imágenes obtenidas de Lincoln Gray. Chapter 10. Vestibular System: Structure and Function. James Madison University.

La apertura de los canales mecanotransductores provoca la entrada de los iones K^+ a la célula de forma pasiva, debido a la mayor concentración de este ion en la endolinfa que en el interior de la célula. Sin embargo, ya que la única parte de las células ciliadas que está en contacto con la endolinfa son los estereocilios, la salida de estos iones se realiza de forma pasiva a la perilinfa por haber en ésta una concentración menor de K^+ que en la célula. Los transportadores de iones utilizan alrededor de un tercio de la energía corporal y hasta 66-70% del ATP neuronal (Howarth et al., 2012; Simmers, 2012), por lo que la difusión pasiva resulta en un ahorro importante en las células ciliadas.

La despolarización de la célula ciliada por la entrada del K^+ provoca la apertura de los canales de calcio situados en la parte basolateral de la misma. Con ello, el flujo de calcio al interior de la

célula estimula la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato a las fibras nerviosas. Por el contrario, en el caso de que los estereocilios se desplacen hacia el lado opuesto del quinocilio, las células ciliadas se hiperpolarizan a causa del cierre mecánico de los canales de transducción.

2.3 Tipos de células ciliadas

Las células ciliadas de las crestas difieren en la longitud de sus estereocilios respecto a las del utrículo/sáculo, pero, además, dentro de un mismo órgano sensorial, existen dos poblaciones de células ciliadas: las de tipo I (HCI) y las de tipo II (HCII).

Las HCI aparecen más tarde a nivel evolutivo y se encuentran únicamente en amniotas (reptiles, aves y mamíferos). Estas células tienen un cuerpo celular morfológicamente similar a un ánfora por su estrechamiento en la parte apical (Ricci et al., 1997). Adicionalmente, cuentan con un tipo de sinapsis único en el sistema nervioso donde las terminales neuronales envuelven por completo su parte basolateral formando una sinapsis en forma de cáliz (Bonsacquet et al., 2006; Dalet et al., 2012).

Las HCII, por otro lado, tienen una morfología cilíndrica, aunque pueden presentar extensiones basales. Éstas pueden tener múltiples sinapsis en forma de botón (Lysakowski et al., 1996; Eatock et al., 1998), y se encuentran en una mayor proporción en las zonas periféricas de los epitelios sensoriales vestibulares.

La diferencia funcional entre ambos tipos celulares todavía no se ha establecido por completo. Con todo, la mayoría de los estudios indican que las células ciliadas de tipo I son receptores de adaptación rápida o acción fásica especializados en la transducción de estímulos de alta frecuencia, como por ejemplo en respuesta a la pérdida del equilibrio. Las células ciliadas de tipo II en cambio, tendrían una papel más tónico o sostenido como en el control de la postura corporal (Eatock, 2018).

A nivel molecular se sabe relativamente poco qué diferencian ambos tipos celulares, pero han sido identificados y validados la expresión de tres marcadores específicos: *Anxa4* y *Mapt* para HCII y *Spp1* para HCI (McInturff et al., 2018). Adicionalmente, la proteína de unión al calcio calretinina se expresa a nivel citoplasmático en grandes cantidades en las células ciliadas de tipo II (Desai et al., 2005a).

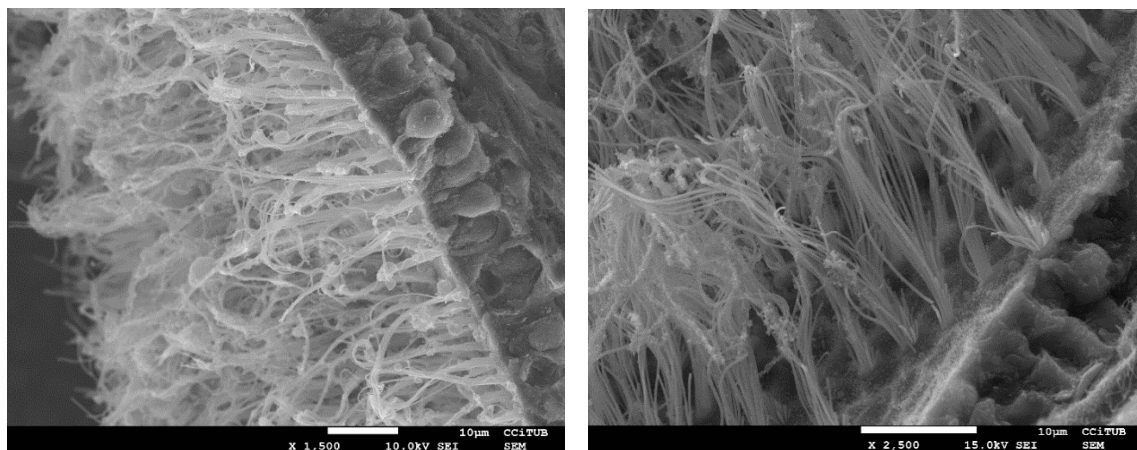


Figura 15. Imágenes propias de microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se muestra el corte transversal de un epitelio vestibular de rata con sus células ciliadas.

2.4 Las células de soporte

Las células ciliadas se encuentran rodeadas de células de soporte, un tipo celular de la que se han establecido analogías en otros sistemas sensoriales, incluidas las células sustentaculares olfativas y la glía retiniana de Müller (Rubel et al., 1991). Las células de soporte tienen una importante función como mediadores del desarrollo, función y muerte de las células ciliadas, así como en la remodelación tisular (Jagger y Forge, 2006; Tritsch et al., 2007; Lahne y Gale, 2008; Bird et al., 2010,). Además, en los organismos que tienen capacidad para regenerar las células ciliadas, las células de soporte sirven como precursoras de las nuevas células.

Las células de soporte también tienen la función de eliminar mediante fagocitosis las células ciliadas muertas, de una forma análoga a la de cuerpos neuronales por la microglía. Muchas de estas funciones celulares de apoyo son paralelas a la glía en su relación con las neuronas. La Figura 16 muestra un epitelio en el que ha habido pérdida de células ciliadas por daño ototóxico, y gracias a ello, la identificación de las células de soporte (con morfología circular y plana visto desde arriba) es más sencilla. En condiciones fisiológicas, en el punto de unión de seis células de soporte, hay una célula ciliada.

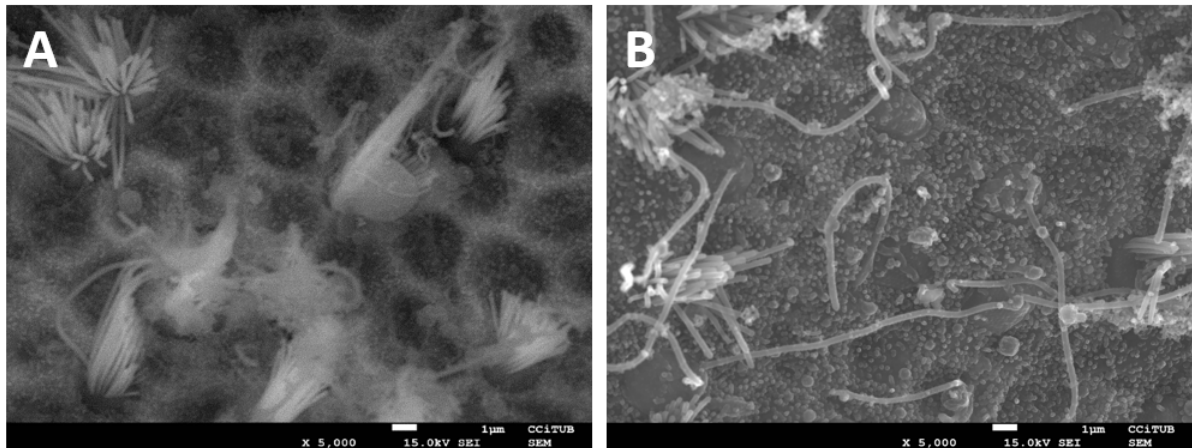


Figura 16. Imágenes propias de microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se muestran las células de soporte (A) y sus microvellosidades (B).

2.5 El sistema aferente

El ganglio vestibular está dividido en superior e inferior, y se encuentra en la parte lateral del conducto auditivo interno (Ropper et al., 2009). En humanos está compuesto por acerca de 20 000 de neuronas bipolares que reciben impulsos de las células ciliadas de las crestas y las máculas.

Las aferentes pueden formar terminales que inervan únicamente células ciliadas de tipo I, conocidas como calyx only, presentes únicamente en las partes centrales/estriolares de los epitelios sensoriales. También hay aferentes exclusivas de células de tipo II, pero éstas son menos comunes y se encuentran únicamente en la parte periférica. Por último, las aferentes dimórficas son las más comunes e inervan células ciliadas de ambas poblaciones (Figura 17).

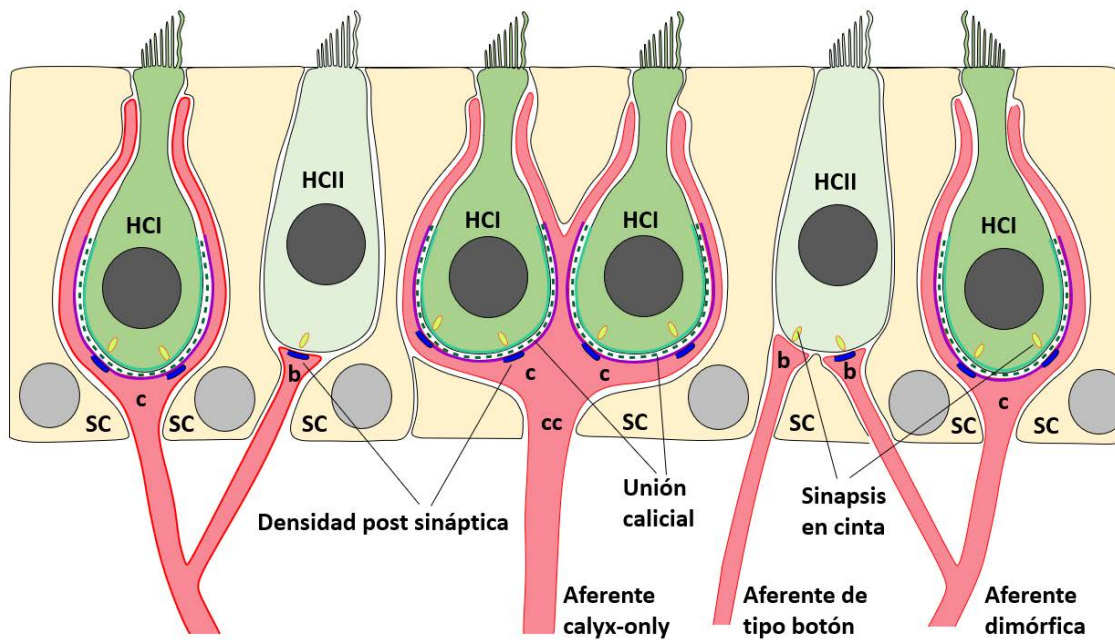


Figura 17. Esquema donde se ilustran los distintos tipos de células ciliadas, así como los diferentes modelos de innervación existentes. Imagen adaptada de Jordi Llorens Baucells.

Otro factor diferencial de las neuronas vestibulares ganglionares es el patrón de descarga que presentan. Las neuronas que inervan las zonas centrales de los tejidos vestibulares exhiben un patrón de descarga más irregular que las que inervan las zonas periféricas (Goldberg et al., 1984; Baird et al., 1988). Las descargas irregulares presentan una mayor ganancia en estímulos de altas frecuencias respecto las regulares, sugiriendo una mejor detección de estímulos rápidos (Hullar et al., 2005; Sadeghi et al., 2007).

En las aferentes irregulares se encuentran las terminales calyx only o dimórficas y en las aferentes regulares las terminales dimórficas o sólo botón. El hecho de que se encuentren ambos tipos de células ciliadas en ambos patrones de descarga complica enormemente el análisis del rol que desempeñan las diversas zonas y tipos de células ciliadas en la fisiología vestibular (Eatock, 2018).

3. Componentes del sistema vestibular

Como se ha explicado anteriormente, el sistema vestibular está formado por dos órganos otolíticos (utrículo y sáculo) y tres canales circulares (superior, posterior y lateral).

3.1 Los órganos otolíticos

El sistema vestibular incluye dos órganos otolíticos: el utrículo y el sáculo. Éstos son responsables de la orientación física en el espacio por su capacidad para responder a las aceleraciones lineales y la fuerza de la gravedad.

Ambos contienen un epitelio sensorial con el nombre de mácula, situado en el plano horizontal

en el caso del utrículo y en vertical en el caso del sáculo, en referencia a la cabeza erguida. La mácula está compuesta de células ciliadas rodeadas de células de soporte, con los estereocilios proyectados hacia el lumen del órgano y en contacto con una capa gelatinosa.

Una de las características distintivas de este tipo de órganos es que, sobre la capa de gelatina, se encuentran unos cristales de carbonato cálcico de 1-5µm de diámetro con el nombre de otoconias. Al ser más densas que la endolinfa, las otoconias provocan la inclinación de los estereocilios de las células ciliadas en ausencia de movimiento, solo por el efecto de la gravedad (Hain et al., 2007) (Figura 18).

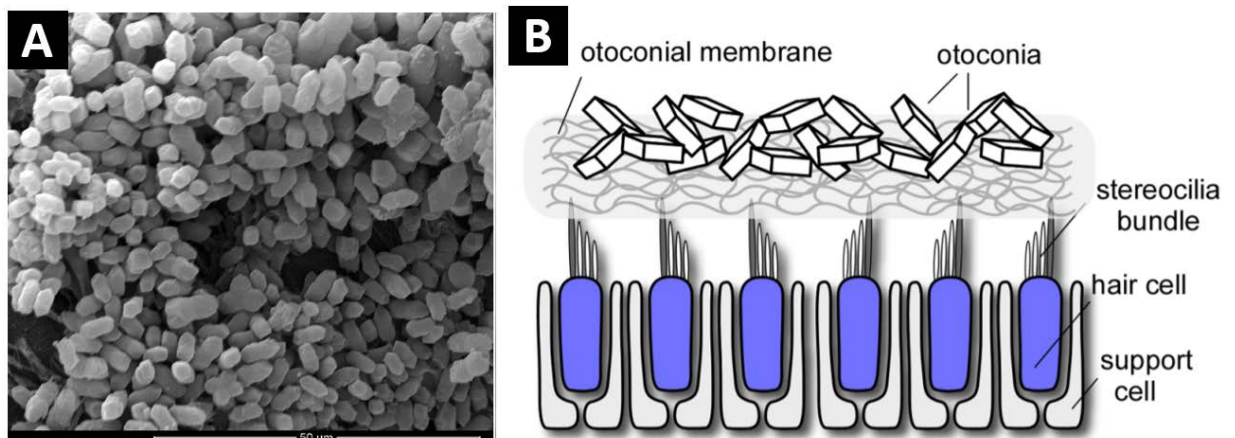


Figura 18. A: Imagen de las otoconias de rata obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Imagen de la tesis doctoral de Lara Sedó Cabezón. B: Esquema estructural de los órganos otolíticos. Imagen obtenida de Deans, 2013.

Tal y como se explicó anteriormente, la inclinación de los estereocilios hacia un lado u otro desencadena cambios en la polaridad eléctrica de la membrana de la célula ciliada.

Una importante propiedad de las máculas es su adaptación sensorial. Cuando el estímulo permanece invariable durante varios segundos, la curvatura de las células ciliadas y su despolarización vuelven a la normalidad progresivamente, permitiendo responder a nuevos cambios posicionales. La mácula del utrículo detecta aceleraciones en el plano horizontal y en contraposición, la del sáculo lo hace en el plano vertical.

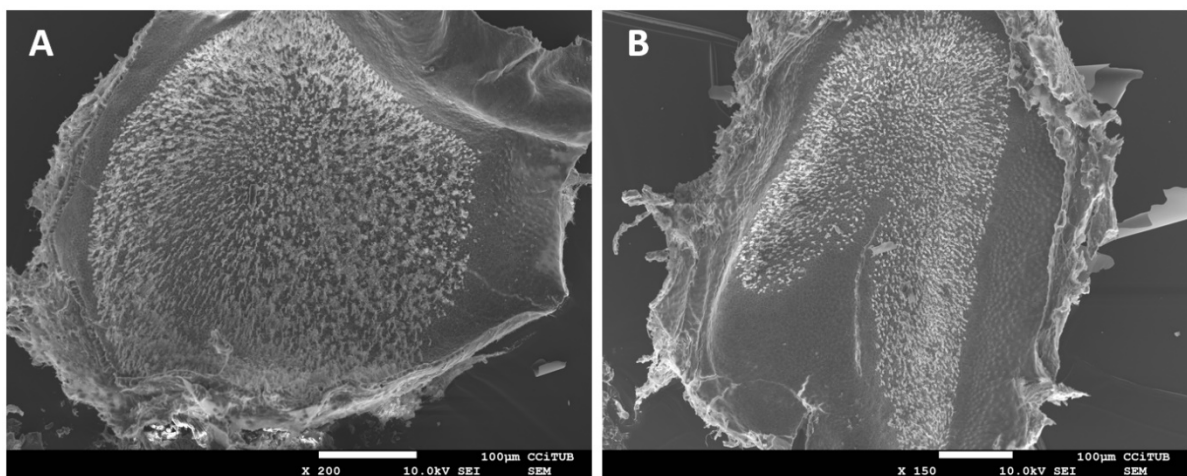


Figura 19. Imágenes propias de un utrículo (A) y un sáculo (B) de rata obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Los estereocilios tienen diferentes longitudes y en cada célula ciliada están ordenados de mayor

a menor, lo que determina su polaridad. En las máculas, las células ciliadas están orientadas hacia una línea imaginaria curvilínea con el nombre de estriola. En este área hay un estrechamiento del tejido en el caso del utrículo y por contra, un engrosamiento en el sáculo. En el primero, los quincilios y estereocilios están orientados en dirección a la estriola y en el sáculo, en cambio, la polaridad de éstos se encuentra hacia el lado opuesto de la zona estriolar (Figura 110). Las diferencias en la polaridad de las células ciliadas en ambos órganos demuestran un patrón de estimulación diferencial dependiendo de la inclinación de la cabeza. Un mismo estímulo estimulará un determinado grupo de células ciliadas, inhibiendo a su vez otro, proporcionando una riqueza de información para generar una interpretación sensorial precisa.

Además, la zona alrededor de la estriola presenta unas características histológicas, bioquímicas y fisiológicas diferentes del resto de la mácula, distinguiendo de esta forma una región estriolar y periférica.

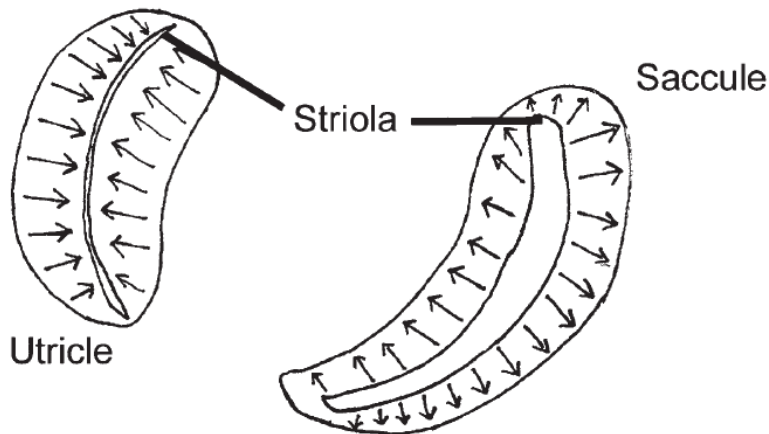


Figura 110. Dibujo esquemático de la zona estriolar de sáculo y utrículo. Las flechas indican la polaridad de los estereocilios. Imagen de Khan & Chang, 2013.

3.2 Los canales semicirculares

Los canales semicirculares son tres y siguen la misma estructura que los conductos semicirculares óseos en los que están contenidos. Estos canales están dispuestos en ángulo recto uno respecto al otro en tres planos diferentes: los dos verticales son los conductos semicirculares superior y posterior, y el tercero, en horizontal, es el conducto semicircular lateral (Figura 111). Esta disposición anatómica proporciona una capacidad para detectar la rotación en cada una de las tres dimensiones del espacio.

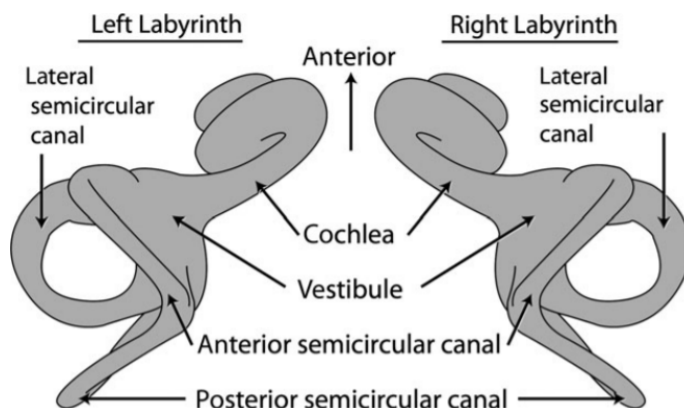


Figura 111. Representación de los tres canales semicirculares en ambos hemisferios. Imagen obtenida de Ekdale, 2016.

Cada uno de los canales termina en una dilatación con el nombre de ampolla, en la que se encuentra la cresta. Ésta es un epitelio sensorial histológicamente similar a la mácula, formado por células ciliadas y células de soporte. En su parte apical hay un material gelatinoso carente de otolitos con el nombre de cúpula, que facilita el movimiento de los estereocilios (Mescher, 2010).

Cuando la rotación de la cabeza permanece constante, la cúpula vuelve a su posición vertical y el potencial de membrana de las células se normaliza. En el caso de una desaceleración rotacional, la cúpula se desplaza en la misma dirección del movimiento, cerrándose los canales iónicos e hiperpolarizándose la célula ciliada.

Ante un mismo estímulo, el movimiento de la endolinfa de los canales semicirculares puede activar las células ciliadas de una cresta e inhibir las que se encuentran en la cresta contralateral. Este hecho permite una detección más fina del movimiento y a su vez existe cierta redundancia sensorial en caso de alteración en algún conducto semicircular.

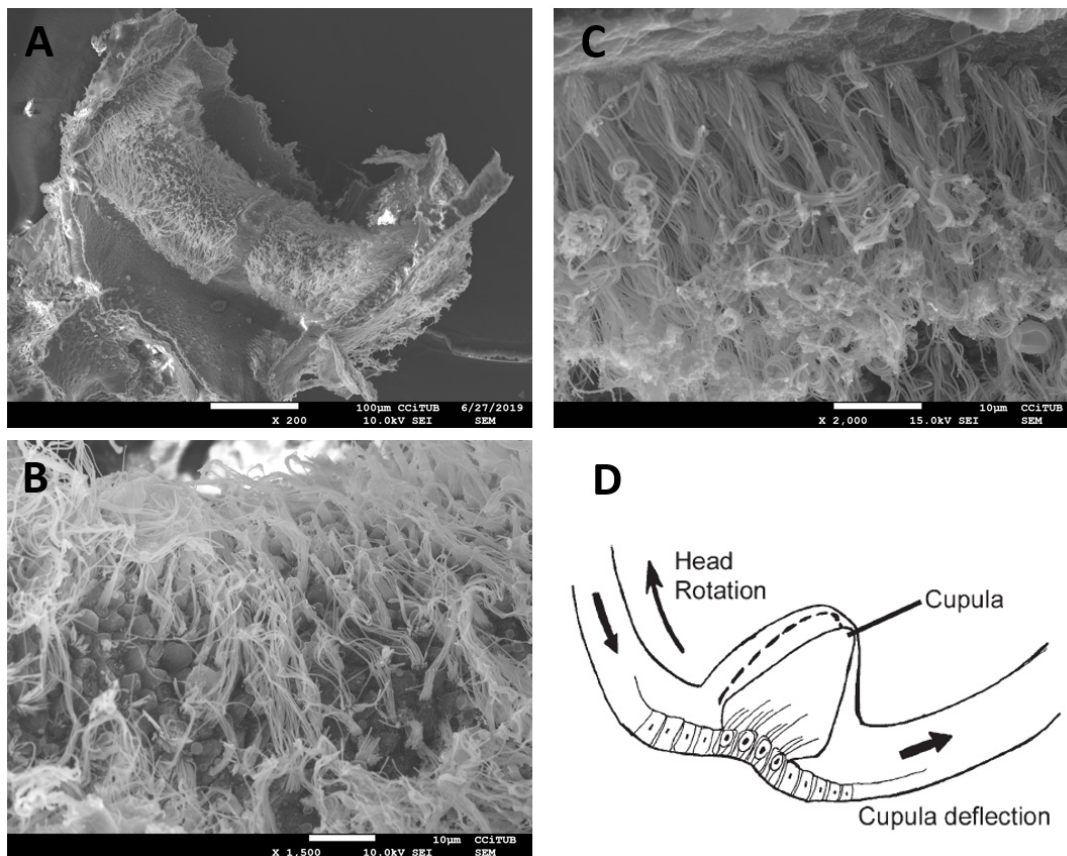


Figura 112. A, B y C: Imágenes propias de microscopía electrónica de barrido de una cresta de rata. A: Vista general de la cresta. B: Ampliación donde se pueden observar las células ciliadas. C: Disposición de los estereocilios en la cresta. D: Representación estructural de la ampolla y de su movimiento en respuesta a la rotación de la cabeza. Imagen de Khan y Chang, 2013.

Al igual que en los órganos otolíticos, en las cresta también existe una región en el centro del epitelio con características diferentes de las zonas periféricas. En este caso, y a diferencia de utrículo y sáculo, no se la denomina estriola.

La Figura 113 muestra la zona central/estriolar de los tres epitelios vestibulares mediante el marcaje por Oncomoculina, una proteína presente mayoritariamente en las células ciliadas de estas zonas.

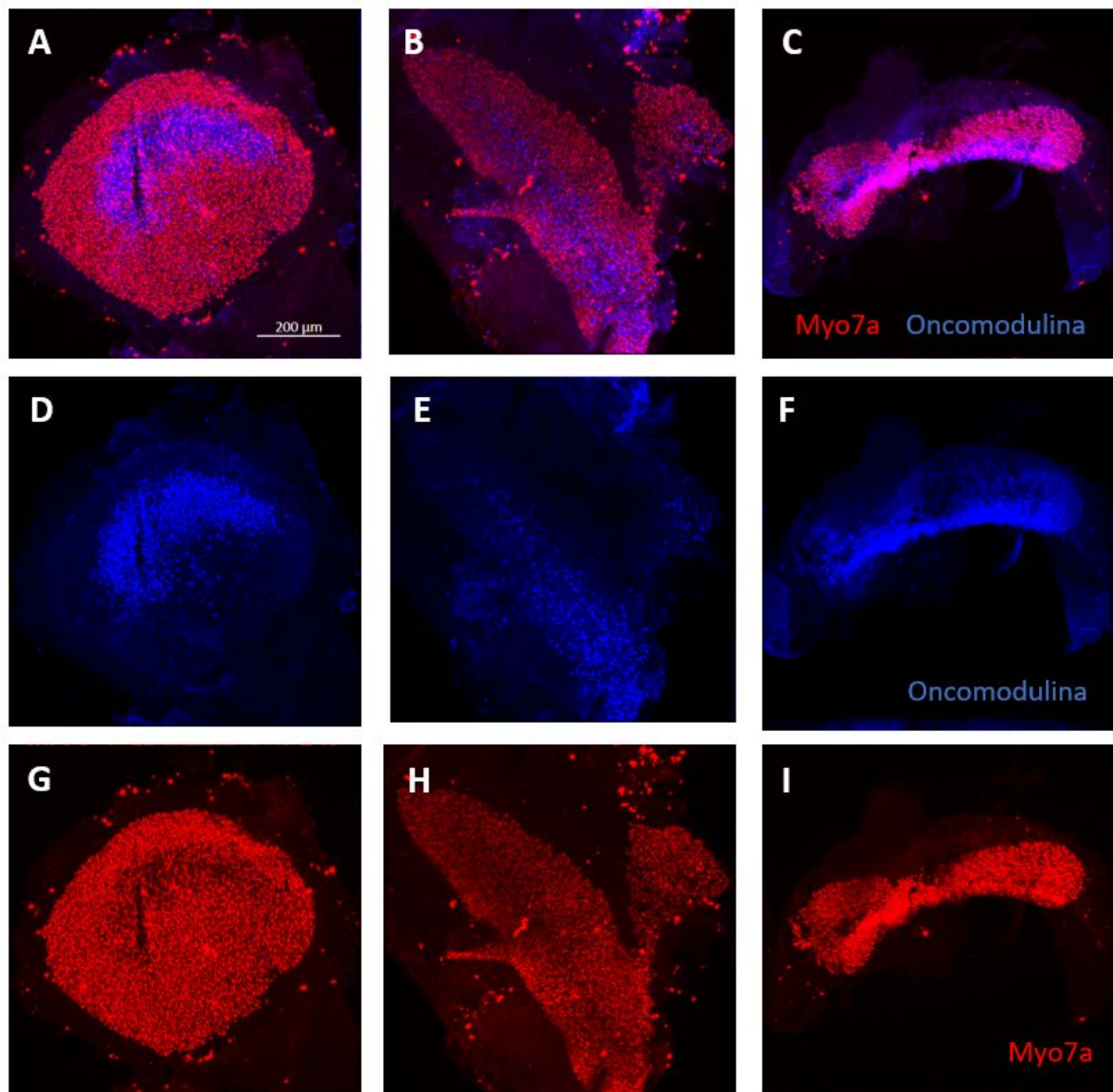


Figura I13. Imágenes propias de microscopía confocal de un utrículo (A, D, G), un sáculo (B, E, H) y una cresta (C, F, I) de rata donde se resaltan las zonas centrales/estriolares en color azul mediante el marcaje por Oncomodulina (D, E, F). Myo7a, en rojo, marca todas las células ciliadas (G, H, I).

4. Las uniones caliciales

4.1 Características de la unión

En las uniones entre la célula ciliada de tipo I (HCI) y la neurona, esta última envuelve por completo la parte basolateral de la célula ciliada, formando una sinapsis en forma de cáliz. En estas uniones existen regiones electrodensas a nivel ultraestructural por la presencia de proteínas de adhesión, proteínas de matriz extracelular y canales iónicos (Lysakowski et al., 2011). Se ha estudiado su importante función en la formación y mantenimiento del gradiente

de cargas, además del soporte estructural en la sinapsis (Faivre-Sarrailh et al., 2004). En vertebrados las uniones de este tipo mejor descritas son las presentes en los contactos entre los axones y las células mielinizadas en las regiones paranodales.

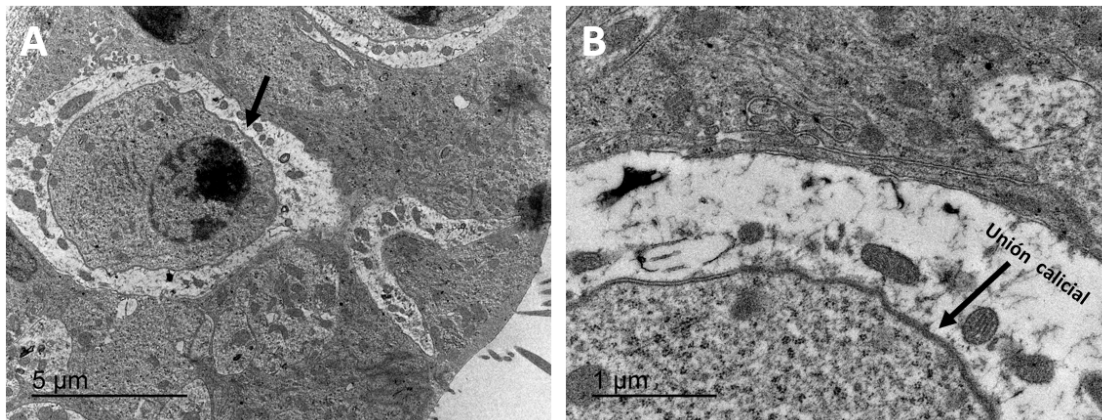


Figura I14. A: Imagen propia de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se muestra la unión calicial entre la célula ciliada de tipo I y la neurona en el epitelio vestibular de la rata. B: Ampliación de la unión donde es posible observar la electrodensidad de la membrana interna del cáliz (señalada con una flecha negra).

En este tipo de terminales, y a diferencia de las HCII, el cáliz separa la hendidura sináptica de las células de soporte adyacentes, impidiendo que éstas puedan eliminar el glutamato mediante el transportador de glutamato EAAT1. No obstante, se ha estudiado que las mismas HCI presentan los transportadores de glutamato EAAT4 y EAAT5, regulando los niveles del neurotransmisor y evitando la excitotoxicidad asociada a su acumulación (Dalet et al., 2012).

En la membrana aferente de la región calicial se encuentra un dímero de dos proteínas distintas: Caspr1 y Contactina-1, y su unión proporciona soporte estructural al contacto sináptico aferente del cáliz con las células ciliadas de tipo I (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011). A pesar del amplio estudio de estas proteínas, no se ha encontrado aún la pareja de unión de este dímero en las células ciliadas.

4.2 Caspr1

Caspr1 (contactin-associated protein 1) es una proteína de adhesión celular presente en las uniones caliciales y regiones paranodales de los axones mielinizados (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011). La Caspr1 es imprescindible para el establecimiento de la unión calicial y la formación de un espacio estrecho entre la célula ciliada de tipo I y la neurona. Este hecho se ha demostrado en ratones knock-out para esta proteína, donde la separación entre ambas células se incrementa hasta en un orden de magnitud (Sousa et al., 2009).

4.3 Contactina-1

La Contactina-1 es una proteína de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas que forma heterodímeros con Caspr1 tanto en las uniones caliciales como en los nódulos de Ranvier. El marcaje de ambas proteínas es comparable por inmunohistoquímica (Lysakowski et al., 2011). Asimismo, se la ha relacionado en los últimos años como marcador de progresión y metástasis en distintos tipos de cáncer (Chen D. H et al., 2015).

4.4 Tenascina-C

La Tenascina-C es una glicoproteína de gran tamaño presente en la matriz extracelular y asociada a las células ciliadas de tipo I (Warchol y Speck, 2007). Ésta se encuentra adyacente a la proteína Caspr1 e interacciona con Contactina-1 (Falk et al., 2002) (Figura 115).

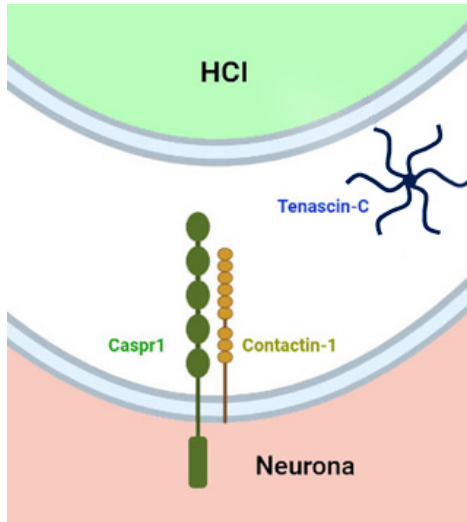


Figura 115. Localización de Caspr1, Contactina y Tenascina-C en las uniones caliciales. Imagen propia creada con Biorender.

Esta proteína se expresa durante la embriogénesis y actúa como moduladora de la adhesión, inhibiendo la unión celular a la fibronectina (Chiquet-Ehrismann, 2004). Su regulación puede ser inducida o reprimida por numerosos factores durante la remodelación o daño tisular (Jones y Jones, 2000), demostrándose también su modulación ante el daño ototóxico.

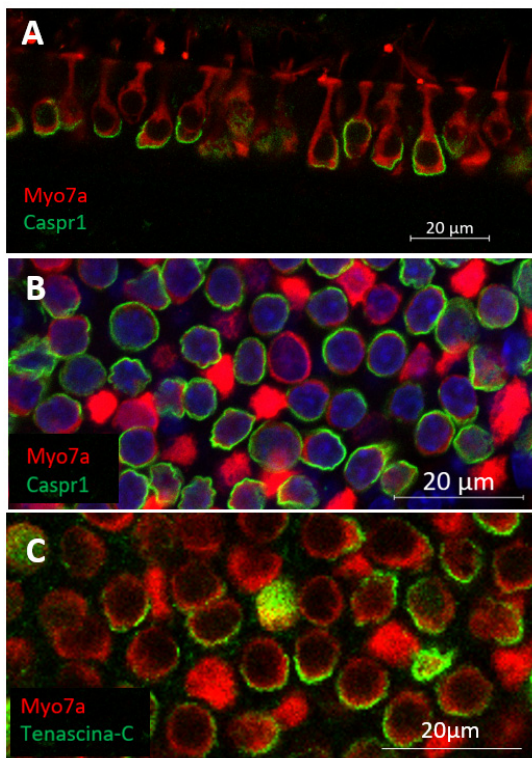


Figura 116. Imágenes propias de microscopía confocal donde aparecen las uniones caliciales identificadas mediante el marcaje de Caspr1 (A y B en vista lateral y superior respectivamente) y Tenascina-C (C).

4.5 KCNQ4

Es un canal de potasio dependiente de voltaje que controla la excitabilidad neuronal. Se expresa abundantemente en la zona calicial de la membrana aferente y de forma esporádica en la cara externa del cáliz (Hurley et al., 2006).

En las crestas, KCNQ4 se encuentra presente en las zonas centrales y periféricas. En contraste, en el utrículo y el sáculo el marcaje de éste es más intenso en la zona estriolar (Spitzmaul et al., 2013).

Se ha comprobado que la expresión localizada de KCNQ4 en la cara interna del cáliz requiere de Caspr1 (Sousa et al., 2009). KCNQ4 colocaliza con Caspr1 en la región calicial de la membrana neuronal (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011) y se redistribuye a lo largo de toda la membrana aferente en ratones carentes de esta proteína (Sousa et al., 2009) (Figura 117). Se cree que KCNQ4 contribuye a la homeostasis del potasio en este tipo de sinapsis (Sousa et al., 2009).

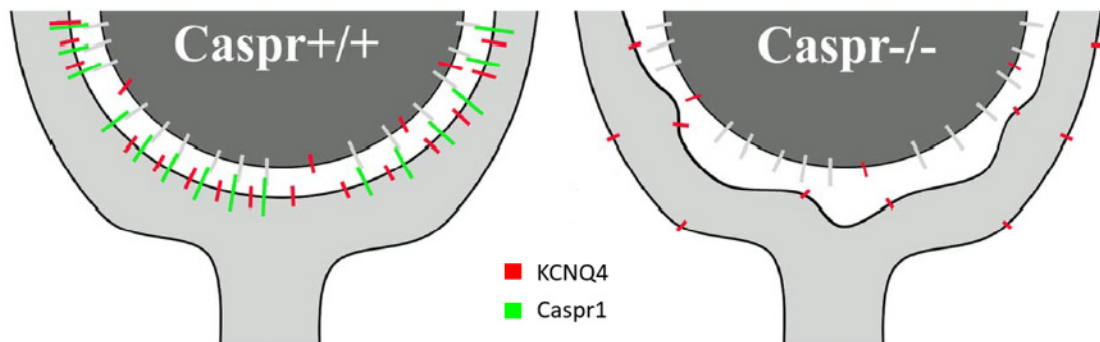


Figura 117. Representación de la localización de KCNQ4 en presencia y ausencia de Caspr1 (Sousa et al., 2009).

4.6 Sinapsis en cinta

La sinapsis en cinta es un tipo de sinapsis caracterizada por la presencia de una estructura electrodensa, la cinta sináptica, que mantiene a las vesículas sinápticas cerca de la zona activa. (Liberman et al., 1990) (Figura 118).

Las sinapsis clásicas en cinta sólo se encuentran en vertebrados y en células en las que existe un requerimientos de señalización extraordinario. Los fotorreceptores y las células bipolares de la retina, por ejemplo, contienen este tipo de sinapsis (Dowling, 1987; Sterling, 1998).

En el sistema vestibular se encuentran en la región basolateral de las células ciliadas de tipo I y II (Lysakowski et al., 2011), y su el número y extensión es mayor en las células de zonas centrales o estriolares respecto a periféricas (Lysakowski y Goldberg, 1997).

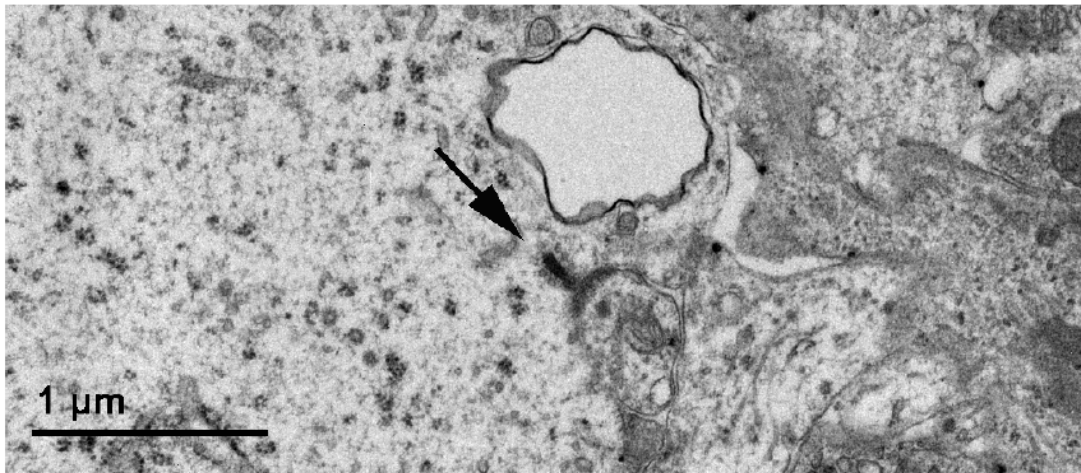


Figura I18. Sinapsis en cinta en una célula ciliada de tipo II de rata observada por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Imagen de la tesis doctoral de Lara Sedó Cabezón.

4.7 Ribeye

A nivel molecular, la sinapsis en cinta está formada por un gran número de proteínas (Zanazzi y Matthews, 2009), donde Ribeye constituye el componente estructural principal de las mismas (Schmitz et al., 2000; tom Dieck et al., 2005).

Ribeye/CtBP2, que es codificada en humanos por el gen CTBP2 (C-terminal-binding protein 2), interactúa con la proteína Bassoon permitiéndola anclarse en la zona activa de la membrana plasmática presináptica (Figura I19). Desde un punto de vista fisiológico, las cintas sinápticas están caracterizadas por una alta tasa de liberación de neurotransmisores mediada por una exocitosis continua de las vesículas sinápticas (Dowling, 1987; Sterling, 1998).

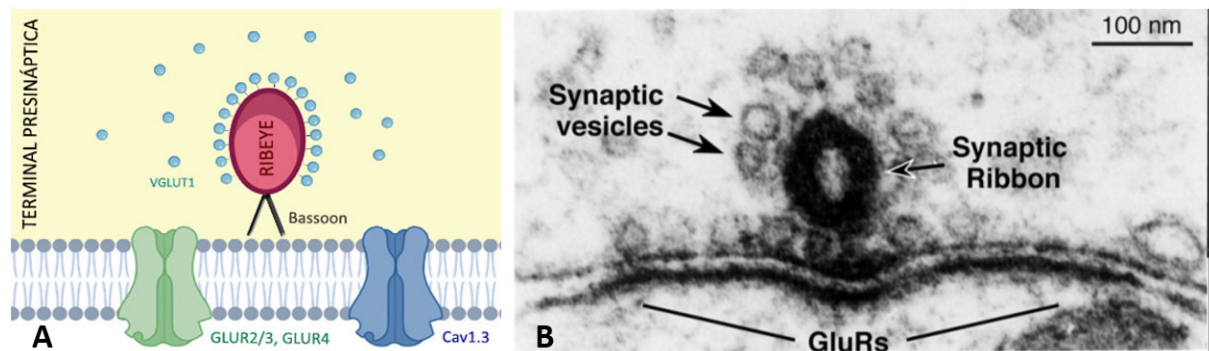


Figura I19. A: Representación estructural de la proteína Ribeye y Bassoon en las uniones en cinta. Imagen propia creada con Biorender. B: Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se muestran las uniones en cinta. Imagen adaptada de Liberman et al., 2011.

4.8 PSD-95

PSD-95 (postsynaptic density-95) es una proteína que se encuentra en la región electrodensa de la membrana de la neurona postsináptica (Hunt et al., 1996). Esta proteína asegura que los receptores estén en estrecha proximidad a los lugares presinápticos de liberación de neurotransmisores. PSD95 está codificado en humanos por el gen DLG4 (Cho et al., 1992; Stathakis et al., 1997)

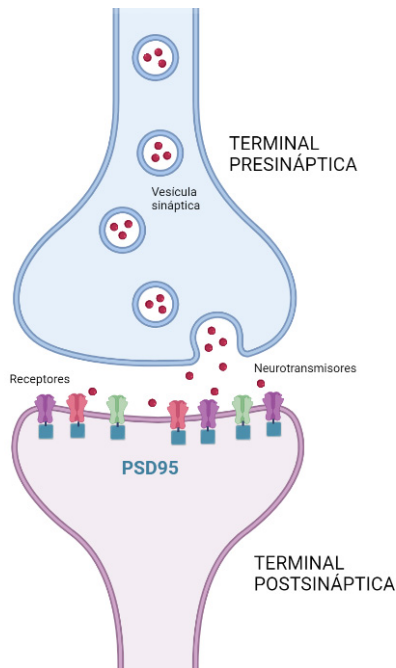


Figura I20. Representación y función de PSD-95 durante la sinapsis. Imagen propia creada con Biorender.

5. La capacidad regenerativa del sistema vestibular

5.1 Regeneración de las células ciliadas

La degeneración vestibular está muy ligada a la pérdida de las células ciliadas; en mamíferos el tejido vestibular tiene una capacidad muy limitada de regeneración o reemplazo celular, dando lugar a una pérdida funcional irreversible (Forge et al., 1993, 1998; Warchol et al., 1993; Tanyeri et al., 1995; Golub et al., 2012).

En caso de pérdida de células ciliadas, normalmente, el lugar ocupado es cubierto por la expansión de las células de soporte adyacentes (Hawkins y Johnson, 1981; Saunders et al., 1985; Cotanche, 1987; Balak et al., 1990; Lombarte et., 1993; Raphael, 1993). Esto supone una medida de protección, ya que, una amplia degeneración de la capa celular que recubre la superficie luminal del epitelio podría conducir a la rotura de las barreras de permeabilidad existentes. Con ello, la endolinfa y perilinfa se mezclarían, rompiendo el equilibrio iónico entre ambos fluidos (Bohne, 1976).

En contraposición, en aves sí que existe una regeneración completa de las células ciliadas, recuperando de esta forma la funcionalidad del tejido (Cruz et al., 1987; Corwin y Cotanche, 1988; Ryals y Rubel, 1988). Durante la regeneración, las células de soporte adyacentes sirven como fuente del remplazo a través de una conversión fenotípica directa habiendo o no pasado anteriormente por un ciclo de división celular (Stone y Cotanche, 2007). Numerosos avances se han hecho en los últimos años para estudiar los procesos moleculares que hay detrás de la regeneración de las células ciliadas en vertebrados no mamíferos, como por ejemplo el estudio del gen *Atoh1* y la vía Notch.

5.2 *Atoh1*

El gen *Atoh1* fue descrito por primera vez como un gen proneural involucrado en la regulación de la formación de mecanorreceptores y fotorreceptores en *Drosophila* (Jarman et al., 1993, 1994). En ausencia de éste y durante el desarrollo del sistema vestibular y auditivo, las células prosensoriales inmaduras no logran diferenciarse a células ciliadas y de soporte, muriendo por apoptosis. (Bermingham et al., 1999; Woods et al., 2004; Pan et al., 2011).

Atoh1 también es crucial para la supervivencia, diferenciación y maduración de las células ciliadas (Cai et al., 2013; Chonko et al., 2013), incluyendo el desarrollo de los estereocilios (Cai et al., 2013). Por lo tanto, este gen resulta crucial para la diferenciación, supervivencia y maduración de las células ciliadas.

En base a estos hallazgos, numerosos estudios han situado *Atoh1* como gen clave en la regeneración de las células ciliadas ante el daño o degeneración tisular. Por ejemplo, en un estudio, la expresión ectópica de *Atoh1* inmediatamente después de una lesión ototóxica dio como resultado la formación de células ciliadas inmaduras y el rescate de la función auditiva en cobayas (Izumikawa et al., 2005). En cambio, estudios posteriores demostraron que la eficacia de este procedimiento es variable y dependiente del tiempo de expresión después del daño (Izumikawa et al., 2008; Atkinson et al., 2014).

5.3 La vía Notch

La vía de Notch se activa en las interacciones intercelulares de corto alcance, controlando distintos procesos celulares como la proliferación, diferenciación y muerte celular. Durante la activación de la vía, la proteína transmembrana Notch es proteolizada, liberando el factor de transcripción NICD, que se transloca al núcleo y modifica la expresión génica.

En el oído interno, durante el proceso de diferenciación de las células prosensoriales a ciliadas, éstas expresan ligandos de Notch que activan la señalización en las células vecinas. Esta activación impide la diferenciación de estas células a ciliadas y promueve su conversión a células de soporte, hecho que abre una relación entre su inhibición y la regeneración. Un estudio demostró que en pez cebra aumentó la regeneración mitótica de las células ciliadas en presencia de daño celular bloqueando la vía mediante inhibidores de la γ -secretasa (Ma et al., 2008).

En mamíferos, en ausencia de daño, la inhibición farmacológica de la señalización de Notch no logra promover en el utrículo adulto la diferenciación de las células de soporte a ciliadas (Collado et al., 2011). Por otro lado, en presencia de daño ototóxico, la inhibición de la vía a través de la inhibición de la γ -secretasa es capaz de aumentar significativamente la expresión de *Atoh1* y promover la expresión de *Myo7a*, un marcador específico de células ciliadas (Lin et al., 2011; Burns et al., 2012; Jung, 2013).

Estos estudios destacan la función de la señalización de Notch en la regulación de la regeneración vestibular, demostrando el valor de su inhibición en posibles terapias futuras.

5.4 La vía WNT

La vía canónica de WNT se encuentra altamente regulada y se activa en momentos concretos como en la renovación celular. Cuando la vía se encuentra inactiva, el regulador transcripcional

β -catenina se une a un complejo de degradación y es eliminada vía proteasoma. Por el contrario, cuando la vía se encuentra activa, el complejo de degradación queda secuestrado en la membrana celular sin poder acceder a β -catenina para regular sus niveles. Esto provoca su acumulación en el citoplasma, que migrará al núcleo promoviendo la expresión de genes relacionados con la división celular como c-Myc.

Los roles de la señalización de Wnt durante la regeneración de las células ciliadas también se han estudiado en los últimos años, dado su papel mitogénico durante el desarrollo. Se ha documentado que la sobreexpresión de β -catenina en colonias de células de soporte aisladas aumenta la expresión de *Atoh1* y la formación de células ciliadas in vitro (Shi et al., 2012).

El papel de la señalización de Wnt durante la regeneración de las células ciliadas ha sido estudiado en pez cebra. La activación de Wnt ha demostrado aumentar el grado de regeneración después del daño (Head et al., 2013; Jacques et al., 2014). De la misma forma, estudios de regeneración en utrículo de ratón neonatal dañado, revelaron que la activación de Wnt / β -catenina aumenta la proliferación de las células de soporte con una regeneración de las células ciliadas in vivo (Wang et al., 2015).

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la activación de la vía canónica de Wnt puede forzar a las células de soporte mitóticamente quiescentes, para proliferar y formar nuevas células ciliadas.

Por tanto, y en base a lo comentado previamente, es factible formular una estrategia regenerativa empleando en primer lugar la activación de Wnt para estimular la proliferación celular antes de introducir una señal prosensorial, como la inhibición de Notch (vía inhibición lateral) o sobre expresión de *Atoh1*, con el objetivo de dirigir la diferenciación hacia las células ciliadas.

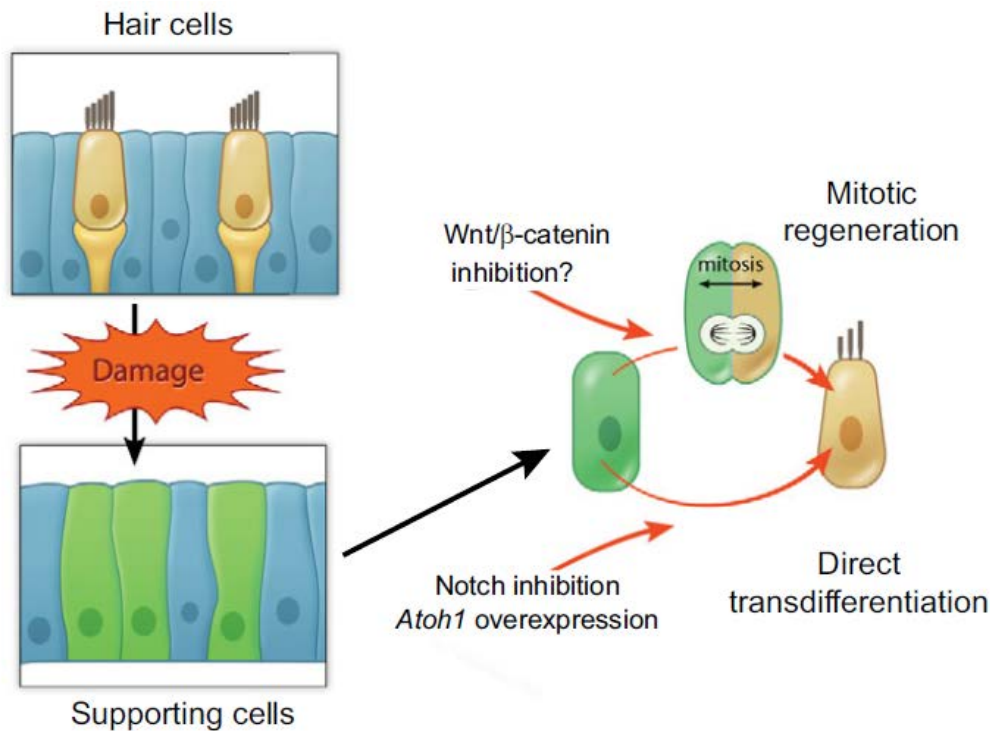


Figura I21. Esquema donde se ilustra la estrategia regenerativa de las células ciliadas a través de las vías Wnt, Notch y expresión de *Atoh1*. Esquema obtenido de Atkinson PJ et al., 2015.

6. Alteración funcional del sistema vestibular

6.1 Disfunción vestibular

La pérdida de la función vestibular es una condición incapacitante caracterizada por vértigos, mareos, mala orientación espacial y dificultad para fijar la vista (Bronstein et al., 2013). Esta pérdida también tiene consecuencias funcionales a nivel cognitivo, endocrino y del sistema nervioso autónomo. Se ha demostrado una relación entre la disfunción vestibular y la reducción en la masa ósea, modificaciones cardiovasculares, alteraciones del ritmo circadiano y un menor rendimiento cognitivo (Besnard et al., 2015; Vignaux et al., 2015; Martin et al., 2016). Además, a nivel epidemiológico se ha atribuido el fallo vestibular como una de las principales causas de caídas en ancianos, afectando a aproximadamente el 65 y 85% de personas mayores de 60 y 80 años respectivamente (Agrawal et al., 2009; Ishiyama, 2009; Ward et al., 2013).

La pérdida vestibular es uno de los principales factores que marcan el empeoramiento de la calidad de vida durante el envejecimiento y en este deterioro, la escasa capacidad regenerativa del sistema juega un papel importante.

6.2 Anomalías del sistema vestibular en humanos

La disfunción vestibular puede ser de origen central o periférico. En el primer caso, la hipofunción vestibular puede ser signo de una patología directamente relacionadas con el sistema nervioso central. Un ejemplo de esto es la esclerosis múltiple, que causa vértigo cerebeloso debido a la degeneración de la vaina de mielina de las neuronas centrales.

El vértigo de origen periférico, por otro lado, se debe a algún tipo de alteración en los órganos vestibulares. Dentro de este amplio grupo se pueden encontrar alteraciones en la mecano-transducción, desequilibrios en la composición iónica de la endolinfa, pérdida de células ciliadas o desconexión entre las células ciliadas y las neuronas vestibulares.

Un ejemplo de alteración vestibular de origen periférico es el neurinoma, el tumor más común del ángulo ponto-cerebeloso. Se ha estudiado que estos tumores secretan moléculas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), que conducen a tipos variables de daño en el oído interno, incluido la pérdida de células ciliadas y neuritis (Dilwali et al., 2015).

La enfermedad de Ménière es otro ejemplo de patología vestibular de origen periférico. Se desconoce en profundidad el desencadenante de esta enfermedad, que carece aún de un tratamiento efectivo. Existen diversas hipótesis sobre su causa: una mala absorción endolinfática, problemas vasculares, autoinmunidad tras una infección viral o modificaciones en la homeostasis hídrica (Merchant et al., 1995; Ishiyama et al., 2006).

Existen otras enfermedades vestibulares de origen periférico, pero una de las más conocidas y prevalentes es la causadas por procesos de ototoxicidad.

6.3 Ototoxicidad

La ototoxicidad es una causa importante de pérdida auditiva y equilibrio en humanos. Los agentes ototóxicos comprenden una amplia gama de compuestos diferentes, desde fármacos hasta disolventes y nitrilos. Algunos de los fármacos en los que se ha demostrado toxicidad para el oído interno son el cisplatino, un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado en tumores sólidos y los antibióticos aminoglucósidos, de los que se hablará en detalle más adelante.

Entre los compuestos ototóxicos se incluyen algunos disolventes ampliamente utilizados en la industria como el tolueno, estireno, tricloroetileno y el cis-2-pentenitrilo (Fechter et al., 1998; Pouyatos et al., 2002; Hoet y Lison, 2008; Saldaña-Ruíz et al., 2012; Campo et al., 2013). Todos ellos tienen en común la afectación de las células ciliadas, dañando tanto el sistema vestibular como el auditivo, y en algunos casos con mayor afectación a uno u otro.

Estudios en animales con exposición aguda o de corta duración a estos compuestos, han demostrado que pueden provocar una pérdida funcional irreversible debido a la muerte de células ciliadas por apoptosis o necrosis. En mamíferos la capacidad regenerativa de estas células es muy limitada, por lo que, ante la pérdida celular, no existe una recuperación funcional efectiva (Llorens et al., 1993; Forge y Schacht, 2000; Groves, 2010; Rubel et al., 2013). En estudios de toxicidad crónica, en cambio, al interrumpir el tratamiento se han visto signos de recuperación parcial o completa en algunos casos (Black et al., 2001, 2004; Sedó-Cabezón et al., 2015).

Conocer los procesos que tienen lugar durante la reparación del daño vestibular resultaría de gran utilidad para entender los mecanismos que intervienen en la homeostasis del sistema. Además, el daño crónico inducido de baja intensidad podría tener puntos en común con la degeneración vestibular asociada al envejecimiento.

6.4 Modelos animales basados en la ototoxicidad

Los modelos basados en ototoxicidad suelen causar un daño simétrico y bilateral que involucra a todo el sistema vestibular. Estos compuestos siguen una secuencia de daño gradual, afectando en mayor grado a las crestas, seguido del utrículo y el sáculo. Además, se ha estudiado que las zonas centrales de los epitelios son más sensibles al daño ototóxico (Aran et al., 1982; Llorens et al., 1993; Balbuena y Llorens, 2003; Sulzemeier y Hoffman, 2017). Estos modelos han sido ampliamente utilizados para estudiar la ototoxicidad de los aminoglucósidos, y así buscar estrategias de otoprotección.

Un ejemplo de especie animal cada vez más utilizada en estudios de ototoxicidad es el pez cebra, por la similitud funcional de los neuromastos de la línea lateral con la cóclea de los mamíferos (Ton et al., 2005). También se han utilizado crestas de anfibios como por ejemplo la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) o la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) debido a que su tamaño facilita las intervenciones quirúrgicas en el oído interno (Bhattacharyya et al., 2005).

En mamíferos, la chinchilla, cuenta con la interesante característica de tener el mismo rango auditivo que el ser humano, a diferencia de otros roedores, que poseen frecuencias más amplias. Esta característica es muy valiosa a la hora de estudiar la pérdida auditiva provocada por los aminoglucósidos (Campbell et al., 2007). Las cobayas también han sido ampliamente utilizadas en estudios con aminoglucósidos por su mayor susceptibilidad a los tratamientos en comparación con la rata y el ratón. Asimismo, tienen la ventaja añadida de poseer un oído

interno más grande (Li et al., 1995; Forge y Schacht, 2000; McFadden et al., 2002; Yorgason et al., 2011).

6.5 Modelos animales en rata y ratón

Las especies de mamíferos previamente mencionadas, en cambio, son heterogéneas a nivel genético, dificultando la replicación de los resultados obtenidos. Por el contrario, la estandarización genética de la rata y ratón, los avances en la manipulación genética de estas especies y las similitudes anatómo fisiológicas con el ser humano, hacen que se continúen utilizando como modelos animales pese a su resistencia innata a los aminoglucósidos (Wu et al., 2001; Gibbs et al., 2004).

Aun así, resulta complicado estudiar la ototoxicidad de forma efectiva en estas especies debido a que se precisan de dosis muy altas del compuesto, a veces cercanas a letalidad, antes de poder observar cualquier signo de ototoxicidad evidente. Por esta razón, han surgido como alternativa estudios de toxicidad en cultivos de órganos y células in vitro (Kalinec et al., 2003). A pesar de que estos resultan de utilidad para analizar los mecanismos degenerativos en células y tejidos, precisan de ser escalados posteriormente al organismo completo.

En la búsqueda de un modelo de ototoxicidad efectivo en rata y ratón, se han utilizado diferentes estrategias para aumentar su susceptibilidad a los aminoglucósidos sin la necesidad de recurrir a dosis excesivamente altas. Algunos de ellos han sido la inyección transtimpánica del fármaco o el uso de vehículos como esponjas de gelatina o fibrina, colocadas en la ventana redonda para conseguir una administración más focalizada (Wanamaker et al., 1998; Sheppard et al., 2004; Murillo et al., 2009).

Alternativamente, se han establecido modelos basados en la exposición repetida que han permitido obtener nueva información sobre procesos moleculares implicados en la toxicidad crónica. Estos modelos se basan en la administración intramuscular diaria del aminoglucósido, obteniendo signos claros de disfunción vestibular (Granados y Meza, 2005; Meza et al., 2006; Murillo et al., 2010). Sin embargo, este tipo de modelos siguen siendo subóptimos por la dificultad a la hora de trabajar con ellos y la poca flexibilidad que ofrecen en cuanto a rangos de concentraciones y vías de administración.

A modo de alternativa al trabajo con aminoglucósidos, se ha descubierto que otro tipo de compuestos, los nitrilos, tienen efectos ototóxicos en una amplia variedad de especies en las que se incluye la rata y ratón. Además, éstos presentan una mortalidad asociada muy limitada o nula, y permiten la realización de lesiones vestibulares graduales gracias a la flexibilidad en cuanto a concentraciones y modos de administración (Llorens et al., 1993; Llorens y Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena y Llorens, 2001; Soler-Martín et al., 2007; Saldaña-Ruiz et al., 2013).

6.6 Generalidades de los nitrilos

Los nitrilos son compuestos orgánicos que contienen en su composición química el radical cianuro (R-CN). Éstos se encuentran de forma abundante en la naturaleza en forma de glucósidos cianogénicos (presente por ejemplo en las almendras amargas) o aminonitrilos (presente en legumbres del género *Lathyrus*). Algunos de ellos tienen propiedades neurotóxicas como, por ejemplo, la leguminosa *Lathyrus sativus*, que causa el latirismo, una enfermedad que

se caracteriza por una permanente, pero no progresiva, paraplejia bilateral simétrica (Getahun et al., 2002). Esta surge en países en desarrollo que basan su dieta durante varias semanas en su consumo debido a la falta de otros alimentos (Jiménez-Díaz et al., 1943; Tyllskar et al., 1992; Banea-Mayambu et al., 1997; Getahun et al., 2005). La enfermedad del konzo tiene un curso muy similar, pero el desencadenante en este caso es el consumo de yuca no procesada adecuadamente. A pesar de esto, el papel de los nitrilos en estas enfermedades no se ha demostrado todavía.

Los nitrilos también se encuentran como disolventes industriales o en procesos de fabricación de resinas, plásticos y fibras artificiales (Ahmed y Farooqui, 1982; Fleming et al., 2010).

Un importante mecanismo de toxicidad de los nitrilos se produce por la liberación de cianuro durante su metabolismo. El mecanismo de acción del cianuro se basa en su afinidad por el hierro férrico (Fe^{+++}) del grupo hemo del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial. La unión de ambos bloquea el transporte de electrones al oxígeno, y con ello, la fosforilación oxidativa. Aun así, el papel de este mecanismo molecular en la ototoxicidad y la neurotoxicidad de los nitrilos es todavía dudoso.

6.7 Ototoxicidad de los nitrilos

Se ha estudiado que numerosos nitrilos provocan daño ototóxico (Llorens et al., 1993; Crofton et al., 1994; Llorens y Demêmes, 1994; Llorens et al., 1998; Seoane et al., 2001a, 2001b; Soler-Martín et al., 2007), mostrando un patrón de toxicidad etiquetado como "clásico", término que hace referencia al modo de afectación de los antibióticos aminoglucósidos (Forge y Schacht, 2000). Este patrón de afectación se caracteriza por una aparente selectividad por las células ciliadas, la afectación tanto del sistema auditivo como del vestibular y una progresión de la degeneración, con mayor afectación en crestas, seguido de utrículo y sáculo. Adicionalmente, estudios de ototoxicidad en diferentes clases de vertebrados han demostrado efectos semejantes, revelando una preservación evolutiva en sus dianas de afectación (Soler-Martín et al., 2007).

Uno de los aspectos que favorecen la utilización de nitrilos en modelos animales de ototoxicidad es su afectación en ratas y ratones con ninguna o muy poca mortalidad asociada (Llorens et al., 1993a; Llorens y Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena y Llorens, 2001; Boadas-Vaello et al., 2005; Soler-Martín et al., 2007; Saldaña-Ruiz et al., 2012, 2013; Rúa et al., 2013). Por todo ello, los nitrilos se han convertido en un modelo alternativo a los antibióticos para definir las bases moleculares de la ototoxicidad "clásica".

7. El IDPN (3,3'-iminodipropionitrilo)

7.1 Molécula y efectos neurotóxicos

El IDPN es un agente ototóxico experimental cuyos efectos se estudiaron por primera vez a causa del cuadro clínico que provocaba en ratas y ratones. Éste se caracterizaba por la presencia de

movimientos repetitivos y anómalos de la cabeza, movimientos en círculo, hiperactividad y dificultades para nadar (Delay et al., 1952; Thuillier y Burger, 1954), y se denominó síndrome ECC (Excitacions with Choreiform and Circling movements) (Selye, 1957) o síndrome del baile del vals (Goldin et al., 1948; Thuillies y Burger et al., 1954).

Este cuadro, provocado por la degeneración sensorial de las células ciliadas (Llorens et al., 1993), también es inducido por otros nitrilos, incluyendo el alilnitrilo (3-butenonitrilo), el crotononitrilo (2-butenonitrilo) y el 2-pentenonitrilo (Tanii et al., 1989a, b; Llorens et al., 1998; Balbuena y Llorens, 2001, 2003). Además, se ha demostrado que el daño inducido a las células ciliadas se produce tanto en el sistema vestibular como en el coclear (Crofton et al., 1994; Greguske et al., 2021).

El IDPN también tiene un efecto sobre los neurofilamentos (Chou & Hartmann, 1964; Griffin et al., 1978; Llorens y Rodríguez-Farré, 1997) que conduce a su pérdida en las aferencias vestibulares (Seoane et al., 2003) así como a las placas motoras (Soler-Martín et al., 2012).

Adicionalmente del oído interno, el IDPN también causa una afectación sensorial en el olfato (Genter et al., 1992) y la vista (Forgacs et al., 1960; Heath y Rutter, 1966; Barone et al., 1995; Seoane et al., 1999), provocando opacidad en la córnea y la degeneración y el desprendimiento de la retina.

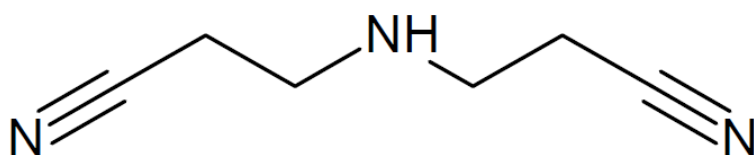


Figura I22. Estructura química de l'IDPN (3,3'-iminodipropionitrilo).

7.2 La ototoxicidad del IDPN

La utilización de este compuesto se ha estandarizado en modelos animales de ototoxicidad por ofrecer una flexibilidad única con respecto a la dosificación y forma de administración. Gracias a la sencillez a la hora de establecer modelos de toxicidad crónica y aguda, el IDPN ha permitido el estudio de las bases moleculares que hay detrás de cada uno de estos procesos.

En los modelos de exposición aguda a dosis altas, se ha observado que el IDPN provoca la necrosis de las células ciliadas. Sin embargo, en modelos de exposición subagudos, éstas siguen una muerte celular de tipo apoptótico. Durante la necrosis, las células se hinchan y se rompen tanto mitocondrias como membranas celulares, con la consecuente fuga de contenido citoplásmico y la inducción de respuestas inflamatorias. La apoptosis, por el contrario, es un proceso de muerte celular orquestado que ocurre con el objetivo de eliminar células no deseadas, funcionalmente anormales o dañadas (Kerr et al., 1972; Searle et al., 1975; Wyllie, 1987; Bright et al., 1994). La pérdida funcional en ambos casos es totalmente irreversible por la disminución en el número de células ciliadas que ocasiona.

No se observó daño aparente en las terminales vestibulares aferentes en ninguno de los dos modelos de toxicidad (Llorens y Demêmes, 1994; Seoane et al., 2001a).

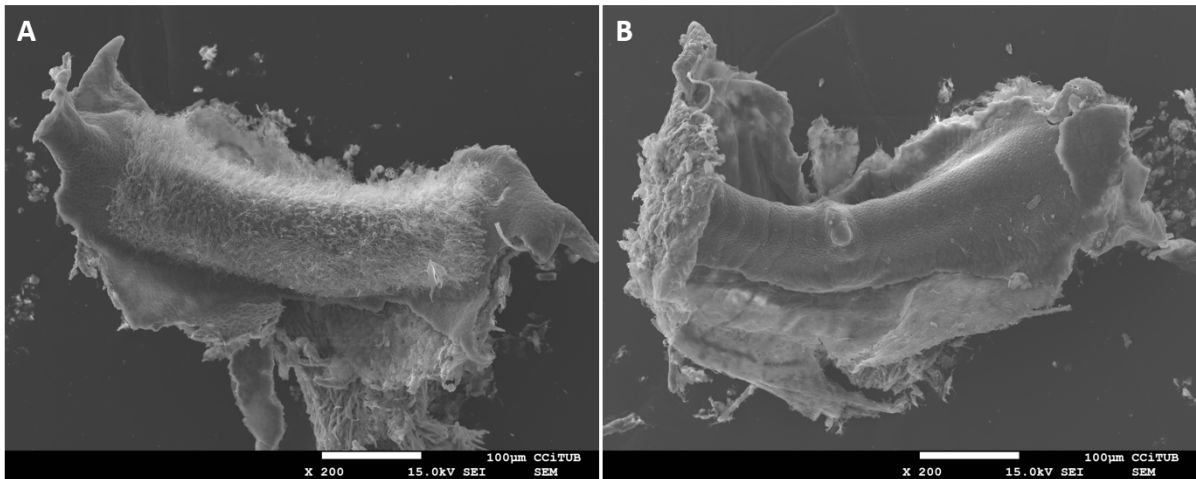


Figura I23. Imágenes propias de microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se muestra una cresta control de rata (A) y una cresta que ha perdido todas las células ciliadas a causa de la exposición aguda al IDPN (B).

En el modelo de exposición crónica, en cambio, se desencadenan unos mecanismos moleculares totalmente distintos a los descritos anteriormente. En éste, existe una separación entre la célula ciliada y la neurona por la pérdida de proteínas de adhesión en la unión calicial, entre ellas Caspr1. Al perder el contacto entre ambas, se produce una retracción y fragmentación de las aferentes, acompañado de un desmantelamiento general de la unión (Seoane et al., 2001b; Sedó-Cabezón et al., 2015) (Figura I24).

Curiosamente, se ha demostrado que este proceso es totalmente reversible. Al detener el tratamiento en este punto de la lesión (tras 4 semanas en el modelo de IDPN a 20mM en rata) ambos tipos celulares vuelven a reconectarse, la unión calicial se restablece y se consigue una recuperación funcional completa (Sedó-Cabezón et al., 2015). La misma secuencia de sucesos ha sido descrita en el ratón (Greguske et al., 2019).

Es interesante puntualizar que la pérdida observada en Caspr1 no se traduce en una baja expresión o distribución de la proteína en las regiones paranodales, donde Caspr1 es un componente clave (Einheber et al., 1997; Greguske et al., 2021).

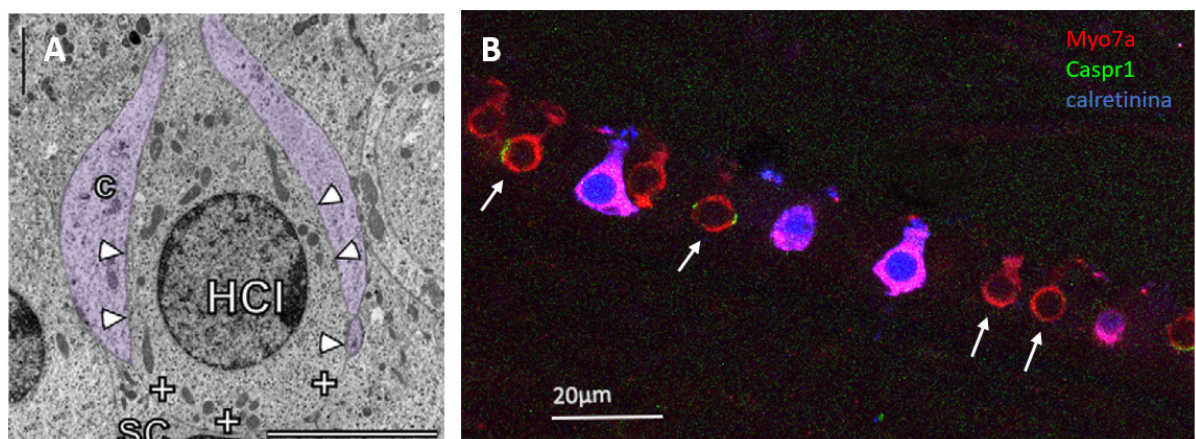


Figura I24. A: Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el que aparece la retracción calicial de una célula ciliada de tipo I con su aferente (Sedó Cabezón et al., 2015). HCl: célula ciliada de tipo I, SC: célula de soporte, C: cáliz. B: Imagen propia de microscopía confocal donde se muestra la fragmentación y desaparición de los cálices (en verde con Caspr1) en células ciliadas (marcadas con Myo7a en rojo).

Además, si se alargaban los tiempos de exposición (8 semanas en el modelo de IDPN a 20mM en rata), los animales perdían la capacidad de recuperar su función vestibular una vez interrumpido el tratamiento. Se analizaron los tejidos de las ratas por microscopía electrónica y se observó que las células ciliadas se extruían del epitelio vestibular (Seoane et al., 2001a). Además, éstas permanecían en el tejido cierto tiempo antes de abandonarlo definitivamente (Figura 125). Sorprendentemente, en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM), estas células mostraban una apariencia normal, sin excesiva vacuolización o daño. Adicionalmente, con la técnica TUNEL se comprobó que las células en extrusión no padecían la fragmentación de DNA característica de la apoptosis (Seoane et al., 2001a).

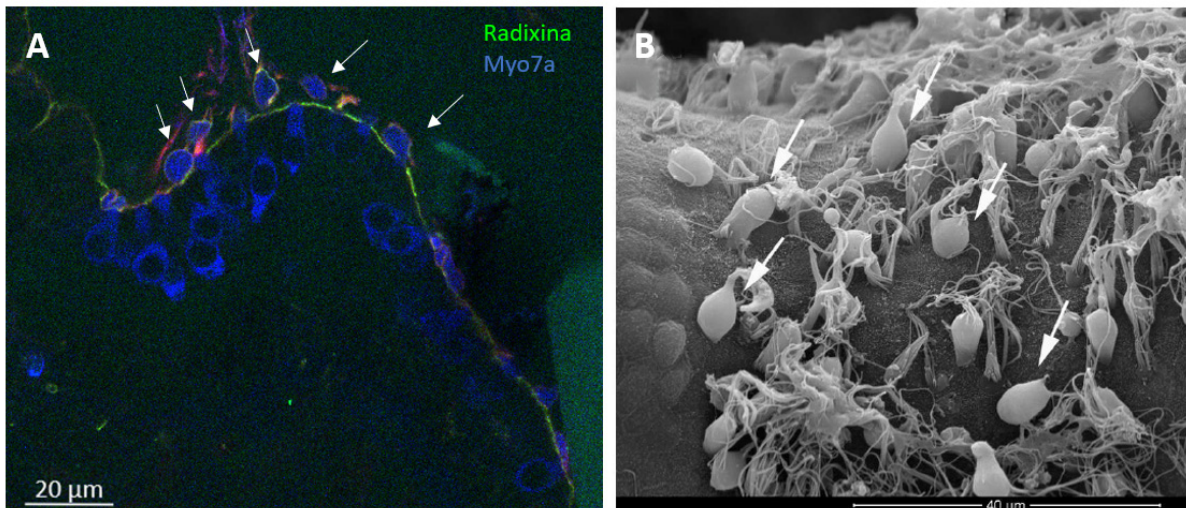


Figura 125. A: Imagen propia de microscopía confocal donde se observa el proceso de extrusión por IDPN en células ciliadas de rata (marcadas en azul con Myo7a y señaladas con una flecha blanca). En verde se ha marcado Radixina para identificar la delimitación apical del epitelio. B: Imagen de microscopía electrónica de barrido de la tesis doctoral de Lara Sedó Cabezón donde aparecen células ciliadas de rata en extrusión (señaladas con una flecha blanca).

Este proceso es una forma poco común de eliminación celular que se produce en casos concretos en el organismo. El ejemplo mejor conocido es el de las células de la mucosa intestinal, donde su extrusión desde la parte apical de las vellosidades forma parte de la continua renovación del epitelio. Este fenómeno es complementario a la generación de nuevas células epiteliales en las partes profundas de las criptas intestinales, que renovarán progresivamente el tejido por completo (Stappenbeck et al., 1998).

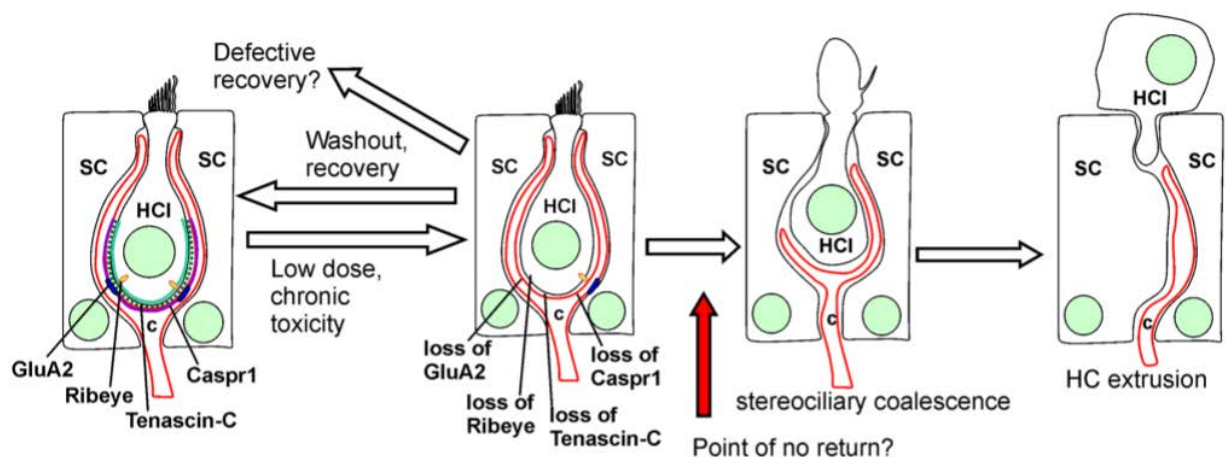


Figura 126. Esquema donde se ilustra la degeneración crónica de las células ciliadas ante la exposición crónica por IDPN. HCl: célula ciliada de tipo I, SC: célula de soporte, c: cáliz. Imagen de Greguske et al., 2019.

Estos resultados presentan dos mecanismos totalmente diferentes de respuesta de las células ciliadas ante el estrés ototóxico por un mismo compuesto (Seoane et al., 2001a; Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). Mientras que la exposición corta a dosis altas de IDPN desencadena la muerte temprana por apoptosis o necrosis, la exposición crónica provoca el desacoplamiento entre la célula ciliada y la neurona, caracterizado por la pérdida de proteínas de adhesión. Finalmente, si el estrés ototóxico crónico se mantiene en el tiempo, las células ciliadas terminan abandonando el epitelio por extrusión.

Como se ha comentado anteriormente, el IDPN también afecta a los axones, provocando la pérdida de neurofilamentos en las terminales aferentes vestibulares (Seoane et al., 2003), así como en las placas motoras (Soler-Martín et al., 2012). Esto está asociado a su acción, la cual causa dilataciones en el axón proximal a la célula ciliada, con acumulaciones de neurofilamentos en las neuronas motoras y sensoriales (Chou y Hartmann, 1964). Este proceso se ha relacionado con una alteración en el transporte axonal de las proteínas citoesqueléticas (Griffin et al., 1978), fenómeno propio de enfermedades neurodegenerativas como la ELA (esclerosis lateral amiotrófica) (Carpenter, 1968). La posible relación entre la toxicidad axonal y la ototoxicidad del IDPN no ha sido establecida. Alternativamente, otros nitrilos como el alilnitrilo y el crotonitrilo causan toxicidad vestibular (Llorens et al., 1993; Llorens et al., 1998; Balbuena & Llorens, 2001, 2003) pero no axonal (Soler-Martín et al., 2011).

7.3 Limitaciones del modelo de IDPN

El modelo de ototoxicidad por IDPN presenta numerosas ventajas en cuanto a practicidad, flexibilidad de tratamientos y baja mortalidad asociada. Asimismo, gracias a éste se han llegado a conclusiones importantes respecto a algunos de los mecanismos de respuesta de las células ciliadas ante el estrés ototóxico. Sin embargo, el IDPN es un compuesto de síntesis química sin relevancia clínica ni impacto en los seres humanos. Por lo tanto, resulta necesario comprobar si estos resultados son replicables en otros compuestos con mayor trascendencia como los antibióticos aminoglucósidos.

8. Los antibióticos aminoglucósidos

8.1 Origen e historia de los aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos bactericidas producidos originariamente por bacterias gramnegativas del género *Streptomyces* dentro del filo de los actinomicetos. Este tipo de bacterias habitan en el suelo y tienen un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica, como la celulosa y la quitina. Adicionalmente, estas especies poseen un metabolismo secundario complejo en el que producen, a modo de defensa, numerosos compuestos bactericidas que se han utilizado en el ámbito clínico, como por ejemplo la estreptomina.

Precisamente, la historia de los antibióticos aminoglucósidos en el uso humano comienza en 1943 con el aislamiento de ésta por Albert Schatz. La estreptomina se convirtió en el primer

tratamiento efectivo contra la tuberculosis, y sigue siendo hoy en día, uno de los principales fármacos que constituyen la segunda línea de tratamiento.

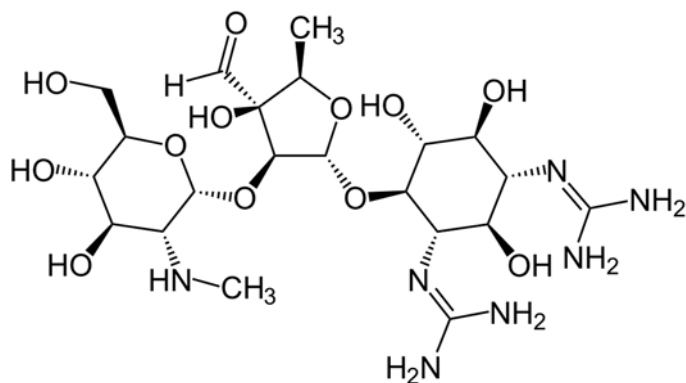


Figura I27. Estructura de la molécula de estreptomicina

Posteriormente, el descubrimiento de la kanamicina en 1957, y más tarde el de la gentamicina y tobramicina, constituyeron un gran avance en el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos, convirtiéndose en las principales herramientas contra este tipo de patologías (Pancoast, 1988). En la década de 1970 surgieron los primeros aminoglucósidos semisintéticos debido a la aparición de resistencias en los aminoglucósidos de la primera generación.

Desafortunadamente, el amplio uso de los aminoglucósidos también puso en manifiesto su toxicidad asociada. Numerosos esfuerzos se han hecho para intentar reducirla o eliminarla por completo, pero ha resultado difícil la modificación de estas moléculas sin afectar a su actividad antimicrobiana.

8.2 Farmacocinética y farmacodinámica

Los aminoglucósidos no se absorben por el tracto gastrointestinal, por lo que es necesario recurrir a vías de administración más invasivas (Gilbert, 2000). La intramuscular es una de las más utilizadas, con la ventaja de que la absorción es total y muy rápida, llegando a concentraciones máximas en suero entre los 30-90 minutos post administración.

Una vez en el interior del organismo, el antibiótico se distribuye libremente en el espacio vascular y de forma relativamente libre en el líquido intersticial de la mayoría de los tejidos. Su fácil distribución se debe a la escasa unión a proteínas y a su alta solubilidad.

Finalmente, los aminoglucósidos son excretados por filtración glomerular sin una alteración metabólica previa. Más del 90% de la cantidad administrada se recupera sin modificar en la orina dentro de las 24h posteriores a la administración. El 10% restante, en cambio, tiene un tiempo de excreción mucho más lento, pudiendo ser detectado en la orina en un periodo de tiempo superior a 20 días post administración (Gilbert, 2000).

Los datos de farmacodinámica de los aminoglucósidos indican que su capacidad bactericida es directamente proporcional a su concentración en el organismo. Por tanto, la estrategia farmacológica consiste en la administración de la dosis más alta posible dentro de los límites de la toxicidad.

8.3 Mecanismo de acción y toxicidad asociada

Los aminoglucósidos están asociados a efectos tóxicos graves que a menudo limitan su aplicabilidad, posología y duración de la terapia. Es posible explicar parte de su toxicidad asociada a partir del mecanismo de acción. Éste se basa en su unión a la subunidad 30S del ARN ribosomal de las bacterias. Con ello, provoca la lectura errónea del ARN mensajero (ARNm) y, en consecuencia, la acumulación de proteínas mal plegadas que conducirá al estrés y lisis bacteriana (Schacht et al., 2012).

Los efectos de los aminoglucósidos generalmente se limitan a los ribosomas de las bacterias por su baja afinidad de unión a los ribosomas eucariotas, debido a las diferencias estructurales existentes (Xie et al., 2011). Sin embargo, las mitocondrias derivaron evolutivamente de bacterias, por lo que, los ribosomas mitocondriales comparten similitudes estructurales con los bacterianos (Fischel-Ghodsian et al., 2004; Guan, 2004). Esto favorece la posible interacción de los aminoglucósidos con las mitocondrias, y con ello, el daño celular caracterizado por la generación de radicales libres, estrés oxidativo y factores proapoptóticos (Warchol, 2010; Huth et al., 2011; Esterberg et al., 2016).

El ribosoma mitocondrial humano está formado por dos subunidades, una pequeña de 28S y una mayor de 39S, donde S es una unidad para medir al coeficiente de sedimentación de una molécula. La subunidad 28S está formada por el ARN ribosómico 12S, y es aquí donde se unen los aminoglucósidos. Ciertas mutaciones puntuales hacen que este ARN sea más similar al ARN ribosómico bacteriano, favoreciendo la unión entre ambos. Actualmente se han identificado cinco mutaciones homoplásmicas en el gen mitocondrial que codifica el ARNr 12S (MT-RNR1), donde la primera en descubrirse y la más prevalente es la A155G (Bardien et al. 2009).

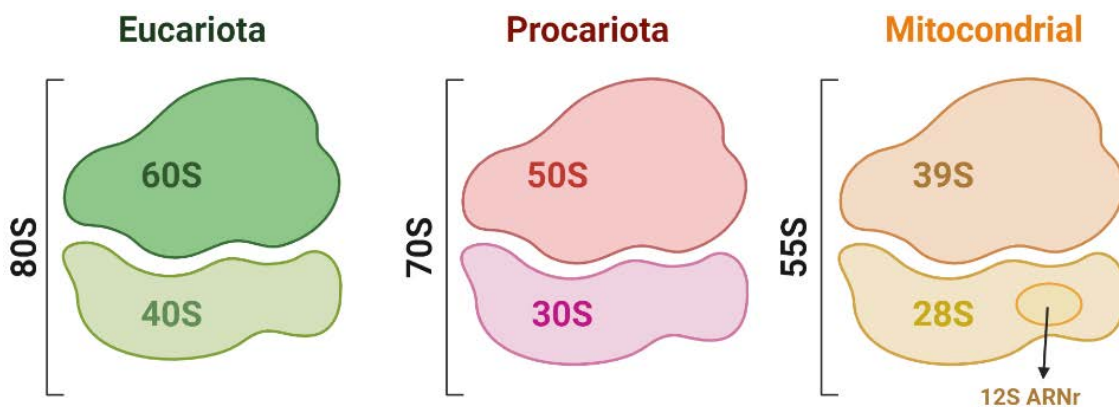


Figura 128. Imagen comparativa donde se ilustra la estructura del ribosoma humano, procariota y mitocondrial. Imagen propia creada con Biorender.

Una posible explicación a la generación del estrés oxidativo por los aminoglucósidos radica en el complejo mitocondrial I, el cual representa el 56% de la región codificadora del ADN mitocondrial (Anderson et al., 1981). La lectura errónea del ARN mensajero por los aminoglucósidos afectaría directamente al complejo, inhibición del cual induce la producción de superóxido mitocondrial (Hasegawa et al., 1990; Cleeter et al., 1992;).

Los efectos adversos graves más comunes de los aminoglucósidos son la ototoxicidad, la neuropatía y la nefrotoxicidad. La lesión hepática es rara, probablemente por el factor limitante de la dosis debido a los demás efectos secundarios.

Los mecanismos subyacentes a su toxicidad selectiva para el riñón y el oído interno continúan sin conocerse a pesar de más de 70 años de investigación. La toxicidad inducida en el riñón es

reversible si se detecta a tiempo por las capacidades regenerativas de las células del túbulo proximal. En contraposición, el oído interno de los mamíferos no tiene esta capacidad, por lo que a menudo los daños ocasionados son irreversibles (Naughton, 2008; Groves, 2010; Kusaba et al., 2014; Lombardi et al., 2016).

8.4 Ototoxicidad de los aminoglucósidos

El daño ototóxico de los antibióticos aminoglucósidos reside principalmente en su afectación a las células ciliadas, tanto en la cóclea como en el sistema vestibular. Aunque todos los aminoglucósidos presentan toxicidad en ambos sistemas, a menudo no en proporciones iguales. Aminoglucósidos como la estreptomina y la gentamicina son predominantemente vestibulotóxicos, mientras que la neomicina y la kanamicina son más tóxicas para la cóclea (Guan, 2011).

La incidencia de ototoxicidad depende de diversos factores como la duración del tratamiento y la posología del aminoglucósido utilizado. Ésta varía ampliamente entre el 28 y el 37% del total de pacientes tratados (Peloquin et al., 2004; Sturdy et al., 2011). Sin embargo, la falta de pruebas vestibulométricas precisas, en comparación con audiométricas, implica una subestimación de los efectos vestibulotóxicos.

Se ha documentado que los aminoglucósidos persisten en el oído interno durante 6 o más meses después de su administración (Fischel-Ghodsian, 2005), hecho que explicaría la mayor susceptibilidad de los pacientes que han recibido tratamiento con anterioridad. Adicionalmente, aquellos con insuficiencia renal son más susceptibles a la ototoxicidad debido a la reducción de la excreción renal, resultando en concentraciones séricas y vida media del fármaco más prolongadas.

Un mecanismo importante de entrada de los antibióticos aminoglucósidos a las células ciliadas se produce a través de la endolinfa, mediante los canales de transducción mecanoeléctricos, que se abren y cierran en respuesta al sonido o a la aceleración (Marcotti et al., 2005; Alharazneh et al., 2011; Vu et al., 2013).

En el interior de las células, estos antibióticos tienen la capacidad de unirse a una amplia variedad de proteínas, sugiriendo la existencia de múltiples mecanismos inductores de la degeneración celular (Karasawa et al., 2011; Jiang et al., 2017). Entre ellos se incluyen el estrés de retículo endoplásmico y su interacción con el hierro, que causa alteraciones en la integridad mitocondrial y genera especies reactivas de oxígeno (Oishi et al., 2015; Esterberg et al., 2016). También, se ha visto que los aminoglucósidos pueden tener un efecto en las cintas presinápticas antes de que se produzca la muerte de las células ciliadas (Liu et al., 2013; Oishi et al., 2015).

Cuando en pacientes existe una pérdida funcional diagnosticada y se detiene el tratamiento, los resultados son muy variables. Éstos oscilan desde la persistencia completa de los síntomas hasta una recuperación completa o incompleta (Black et al., 2001, 2004). Aunque parte de esta recuperación es parcialmente atribuible a fenómenos compensatorios del sistema nervioso central (McCall y Yates, 2011), se conoce muy poco sobre los mecanismos celulares y moleculares detrás del daño vestibular crónico, así como de la posible recuperación.

8.5 Comportamiento de las células ciliadas ante los aminoglucósidos

La opinión generalizada es que la degeneración inducida por los aminoglucósidos se produce por apoptosis (Dulon et al., 1989; Hutchin et al., 1994; Schacht, 1996). Por ejemplo, después de un tratamiento sistémico crónico con gentamicina, las células ciliadas degeneradas adoptan rasgos morfológicos característicos de apoptosis para su posterior eliminación (Forge y Li, 2000; Matsui et al., 2002).

Sin embargo, Li et al. (1995) describen en cobayas dos formas en las que las células ciliadas pueden ser eliminadas del epitelio ante la exposición crónica de gentamicina. En la primera, las células degeneradas mueren por apoptosis (Figura 129A). En la segunda, en cambio, las células son extruidas al exterior del tejido sin sufrir cambios morfológicos (Figura 129B), proceso observado también en el modelo crónico de IDPN (Seoane et al., 2001; Sedó-Cabezón et al., 2015). Ambos modos resultan en la pérdida irreversible de células ciliadas, sin alterar la arquitectura tisular del epitelio y sin estimular una respuesta inflamatoria, dando pie a una posible regeneración tisular.

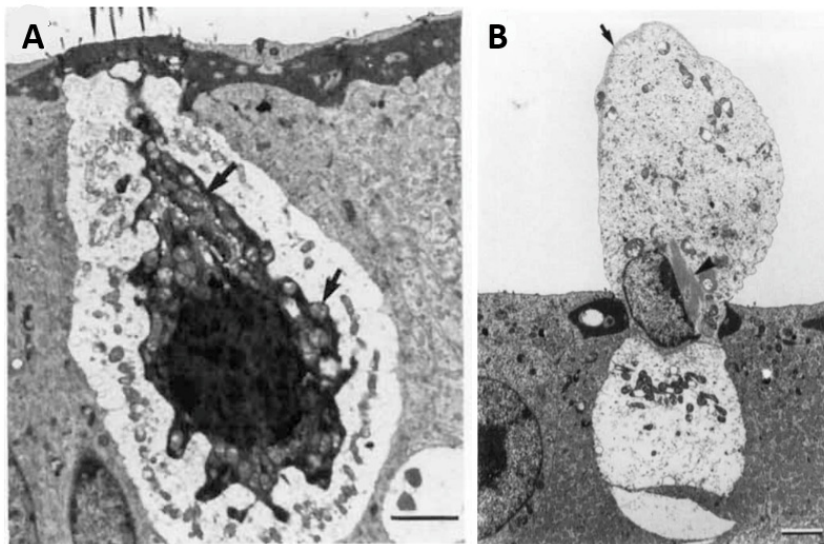


Figura 129. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observan las dos formas de eliminación de las células ciliadas ante la exposición crónica por gentamicina en Li et al., 1995. A: célula apoptótica. B: célula en extrusión.

Posteriormente, Nakagawa et al. (1997) realizaron un análisis en profundidad de la apoptosis en las células en extrusión mediante la técnica TUNEL. Los resultados revelaron signos de apoptosis también en las células extruidas, sugiriendo que en ambas formas de degeneración se entraba en apoptosis. Igualmente, la técnica TUNEL mostró que la fragmentación del ADN ocurría también en las células ciliadas sin cambios morfológicos aparentes, precediendo a cualquier cambio morfológico posterior. En Granados y Meza. (2005) también se describió la presencia de células en extrusión en utrículos de ratas tratadas de forma crónica con estreptomina (Figura 130), aunque no se realizó la técnica TUNEL para comprobar posibles signos apoptóticos.

A diferencia de los vertebrados no mamíferos, donde se ha demostrado que la extrusión es el principal mecanismo de eliminación de las células ciliadas dañadas, los estudios actuales ponen en duda que lo sea en mamíferos. En conjunto, los datos disponibles sugieren que la importancia de la extrusión puede depender del modo de exposición, tal y como se ha demostrado en IDPN (Seoane et al., 2001a).

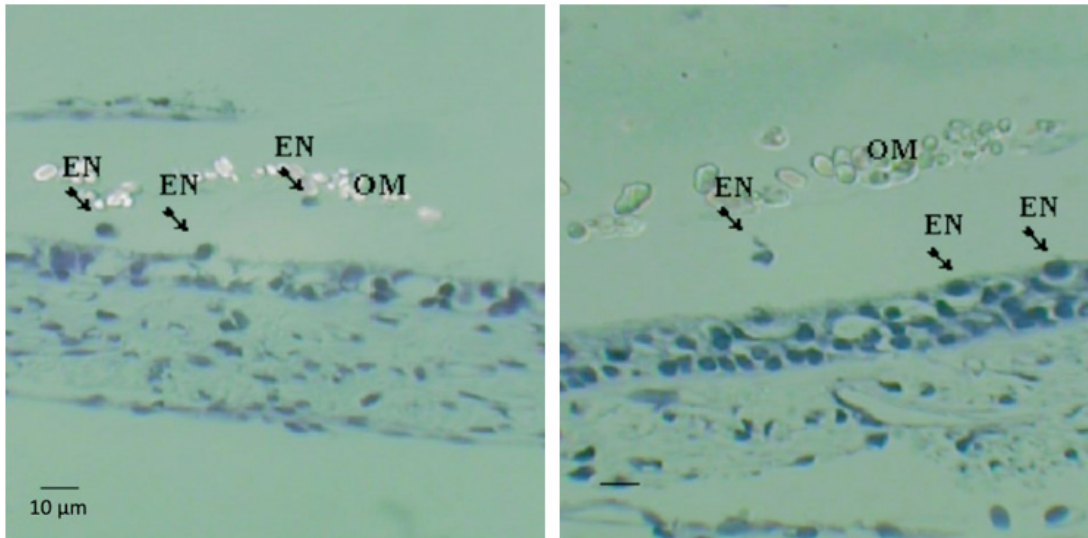


Figura 130. Imagen de microscopía óptica que muestra la extrusión de células ciliadas en membranas utriculares. EN: célula en extrusión, OM: membrana otolítica. Granados y Meza, 2005.

8.6 Estrategias de otoprotección

Una de las principales estrategias para prevenir la ototoxicidad de los aminoglucósidos ha sido bloquear la producción y los efectos de los radicales libres asociados al tratamiento mediante el uso de antioxidantes (Kalinec, 2005; Sha et al., 2006; Chen et al., 2007; Huth et al., 2011; Brock et al., 2012). Como se ha comentado anteriormente, los aminoglucósidos reaccionan con el hierro para generar especies reactivas de oxígeno. Un abordaje alternativo al mismo problema se puede lograr reduciendo la disponibilidad de hierro mediante quelantes, como la deferoxamina y dihidroxibenzoato. Además, este procedimiento presenta la ventaja de que no interfiere en su eficacia terapéutica (Chen et al., 2007).

Otro mecanismo de otoprotección ampliamente estudiado consiste en evitar que los antibióticos lleguen a la célula ciliada por su principal vía de entrada, los canales de transducción mecanoeléctricos. Para ello, se ha propuesto el diseño específico de bloqueadores de estos canales que compitan con los aminoglucósidos por su entrada (Gale et al., 2001; Marcotti et al., 2005; Alharazneh et al., 2011; Kenyon et al., 2021). Adicionalmente, el compuesto debería de ser un bloqueador reversible no permanente que se administrase juntamente con el tratamiento de forma sistémica. Alternativamente, se han diseñado aminoglucósidos modificados para disminuir su entrada a las células ciliadas, con la consiguiente disminución de su ototoxicidad (Huth et al., 2015).

Por otro lado, la modificación química de los aminoglucósidos para hacerlos menos reactivos a las células ciliadas también es una propuesta interesante. La apramicina, es un aminoglucósido que tiene una actividad antimicrobiana potente y de amplio espectro con relativamente poca ototoxicidad asociada. Esto se debe, al menos parcialmente, a su baja actividad contra los ribosomas mitocondriales (Matt et al. 2012). Partiendo de la apramicina como modelo, la idea sería sintetizar un antibiótico que mantuviera sus capacidades antimicrobianas y tuviera un bajo efecto ototóxicos o una difícil entrada a las células ciliadas.

8.7 Los aminoglucósidos y la tuberculosis

La tuberculosis es una infección pulmonar crónica producida por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Es una de las principales enfermedades infecciosas del mundo con un tercio de la población mundial infectada (Duggal y Sarkar, 2007; Jones-López et al., 2011). La alta incidencia de personas inmunodeprimidas por VIH ha propiciado la cronicidad y gravedad de los casos. Actualmente nueve millones de personas al año son diagnosticada y dos mil millones mueren a causa de la tuberculosis.

La aparición de cepas de tuberculosis resistentes se ha convertido en motivo de alarma mundial y es debido, en gran parte, al mal uso de los antibióticos (Lienhardt et al., 2012). Este hecho ha forzado la utilización de medicamentos relegados con anterioridad a una segunda línea de tratamiento por su toxicidad como las aminoglucósidos. Debido a que la estreptomina constituye una terapia muy económica, además de tener un inicio rápido en la acción bactericida, se ha convertido en el principal agente terapéutico utilizado en la tratamiento de la tuberculosis en países en desarrollo.

El uso generalizado de la estreptomina es actualmente motivo de preocupación por la afectación vestibular que provoca, causando daños en el epitelio sensorial de las crestas (Meza et al., 1989, 1996) y máculas (Meza et al., 1994, 1996; Fermin et al., 1998), además de su afectación de la función auditiva (Fee, 1980; Wersäll., 1995).

Su amplia administración ha suscitado la búsqueda de variaciones en el tratamiento con el objetivo de reducir su toxicidad asociada. Asimismo, la infección por tuberculosis se caracteriza por seguir un curso lento donde es necesario el tratamiento durante meses, agudizando aún más su toxicidad asociada. Tradicionalmente, y con el propósito de garantizar el éxito clínico, los aminoglucósidos se administraban en múltiples dosis diarias, cada 8 o 12 horas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los datos de farmacodinámica indican que su capacidad bactericida es directamente proporcional a la concentración del antibiótico en el organismo. Por esta razón, el tratamiento ha cambiado a una dosis diaria, conduciendo a una mayor eficacia clínica al producir un pico más alto en su concentración en suero, aumentando así la actividad microbicida (Ali y Goetz, 1997). Metaanálisis de ensayos clínicos que comparan ambos regímenes terapéuticos (una o múltiples dosis al día) reflejaron la superioridad de una administración diaria en su capacidad bactericida con, además, una reducción en la incidencia de nefrotoxicidad (Rotstein y Mandell, 2004; Turnidge, 2003). Por otro lado, la evaluación de la ototoxicidad en los análisis no mostró ninguna tendencia clara sobre qué régimen de tratamiento resultaba menos nocivo para el oído interno (Rotstein y Mandell, 2004).

9. Evaluación funcional del sistema vestibular

9.1 Evaluación vestibular en humanos

Se conocen diferentes patologías vestibulares que afectan solo a uno de los diez epitelios vestibulares (por ejemplo, el vértigo postural paroxístico benigno), todos los epitelios de un solo lado (por ejemplo, la enfermedad de Ménière), solo un tipo de epitelio (por ejemplo, solo los otolitos; Curthoys y Manzari, 2013), o todo el sistema vestibular (como en el caso de la ototoxicidad). Por esta razón, una evaluación óptima de la función vestibular requiere de la

valoración funcional de forma separada de cada uno de los cinco epitelios sensoriales de forma bilateral.

La velocidad o frecuencia de los movimientos constituye también un aspecto crítico durante el diagnóstico, ya que un paciente con alteraciones en la función vestibular puede ser capaz de utilizar información visual para corregir la posición de los ojos durante movimientos lentos, pero no cuando éstos se aceleran (Halmagyi et al., 2017). Como regla general, cuanto más rápido sea el movimiento, mayor será la implicación del sistema vestibular en la generación de la respuesta.

Existen dos reflejos que controlan la posición ocular para fijar la vista de forma adecuada durante el movimiento. Estos son el reflejo vestibulo-ocular (RVO) y el reflejo vestibulo-ocular traslacional (tRVO) (Serra et al., 2013). El RVO genera un movimiento rotacional compensatorio en los ojos en la dirección opuesta a la rotación craneal para estabilizar la imagen en la retina, conservando así la imagen en el centro del campo visual. Por otro lado, el tRVO estabiliza la mirada en respuesta a los movimientos de traslación. La coordinación de este último presenta la dificultad añadida de que los órganos otolíticos responden de igual manera a la inclinación y a la traslación lineal. La respuesta ocular, por el contrario, reacciona de forma diferencial a ambos estímulos.

Una forma sencilla de evaluar directamente el RVO es mediante la maniobra de impulso cefálico (HIT) (Halmagyi y Curthoys, 1988), donde se le pide al paciente que fije la vista en un objeto y el examinador gira rápidamente la cabeza horizontal o verticalmente de una posición a otra (Figura 131). El objetivo de esta prueba es analizar el movimiento ocular compensatorio que permite que los ojos permanezcan en el foco visual. Esta maniobra evalúa déficits vestibulares unilaterales severos en cresta con una mayor sensibilidad y especificidad que otras pruebas utilizadas habitualmente en la exploración médica (Wuyts et al., 2008). En los últimos años se ha desarrollado una versión asistida por video que se ha convertido rápidamente en el patrón de referencia para la evaluación de las crestas de los canales semicirculares a alta velocidad (Halmagyi et al., 2017).

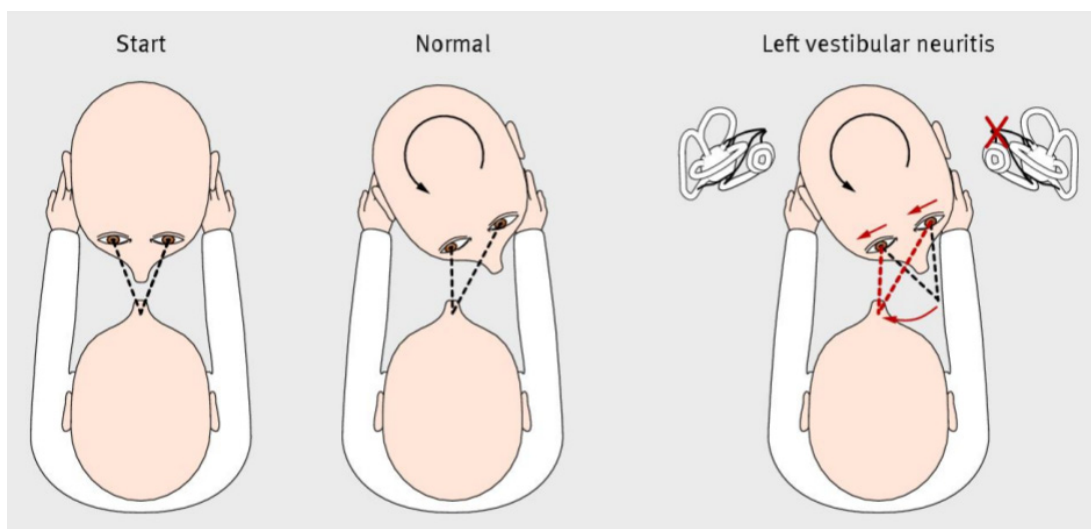


Figura 131. Representación de la realización de la prueba HIT: En las dos primeras imágenes se representa una exploración normal, donde el paciente mantiene la mirada en la nariz del explorador a pesar del movimiento. La tercera imagen, en cambio, corresponde a la realización de la prueba en un paciente con un déficit vestibular en el lado izquierdo. Imagen tomada de Kaski D, Bronstein AM. Making a diagnosis in patients who present vertigo. *BMJ*. 2012;2;345: e6544. Doi: 10.1136/bmj. e6544.

Para evaluar la función de las crestas también se realiza la prueba calórica, en la que se introduce agua fría o tibia en el interior del canal auditivo externo (Kheradmand et al., 2013). Esto provoca un cambio en la temperatura del canal semicircular lateral, desencadenando una alteración en la actividad de la cresta, y con ello, una respuesta nistágmica. Un aspecto útil de la prueba calórica es que proporciona información específica sobre la capacidad de respuesta del canal semicircular horizontal de cada lado de forma independiente. En comparación con la prueba de HIT, la prueba calórica representa un estímulo específico de baja frecuencia que puede revelar diferentes deficiencias vestibulares.

Para evaluar la función los órganos otolíticos, en cambio, se han caracterizado dos potenciales miogénicos diferentes: el potencial evocado miogénico ocular (oVEMP) y cervical (cVEMP) (Curthoys et al., 2012; Curthoys et al., 2014; Colebatch et al., 2016). El oVEMP se registra mediante electromiografía con electrodos de superficie, para medir la actividad del músculo oblicuo inferior contralateral del ojo en respuesta a una vibración acústica u ósea. Aunque la percepción del sonido es una función coclear, está documentado que los órganos otolitos responden a ciertos estímulos auditivos. El oVEMP refleja específicamente una función utricular. Por otro lado, el potencial evocado miogénico cervical (cVEMP), que se registra en el músculo esternocleidomastoideo en respuesta a sonidos fuertes, refleja específicamente una función sacular.

9.2 Evaluación vestibular en roedores

Los animales con alteraciones vestibulares son fácilmente reconocibles a través de su comportamiento espontáneo. Por ejemplo, las ratas y los ratones, dependiendo del grado de disfunción vestibular, caminan en círculos, realizan movimientos exagerados hacia arriba con la cabeza o exhiben cierto grado de hiperactividad (Demêmes y Sans, 1985; Wenngren y Anniko, 1989; Llorens et al., 1993; Kaiser et al., 2001; Soler-Martín et al., 2007; Saldaña-Ruiz et al., 2012a, b).

A pesar de esto, en la actualidad, existen un número limitado de métodos disponibles para la evaluación vestibular en roedores, permitiendo un análisis parcial de las funciones vestibulares. Adicionalmente, pocos estudios incluyen una evaluación cuantitativa de estas alteraciones, valorando en muchos casos únicamente la presencia o ausencia de estos signos para corroborar la disfunción vestibular (Wallace et al., 2002; Russell et al., 2003). En algunos casos, el análisis vestibular establecido precisa de la implementación de una infraestructura costosa e invasiva para los animales como por ejemplo el análisis de RVO (Quinn et al., 1998; Stahl et al., 2000). En otros casos, se utilizan pruebas motoras inespecíficas, como por ejemplo la prueba de rotarod (Schlecker et al., 2011).

Nuestro laboratorio lleva más de 25 años utilizando una batería de seis pruebas de comportamiento (Vestibular Dysfunction Rating, VDR) con el objetivo de obtener un análisis semicuantitativo de la disfunción vestibular (Llorens et al., 1993; Llorens y Rodríguez-Farré., 1997; Boadas-Vaello et al., 2005; Soler-Martín et al., 2007; Saldaña-Ruiz et al., 2013; Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). Este método de evaluación ha demostrado ser robusto, eficaz y específico para la disfunción vestibular bilateral sistémica. Sin embargo, adolece de no ser completamente cuantitativo, ya que se basa en la evaluación subjetiva de cada una de las pruebas. Éstas son puntuadas del 0 (animal control) al 4 (animal con una severa alteración vestibular) dependiendo del grado de disfunción que percibe el investigador. Finalmente, el rango de puntuación global oscila entre 0 y 24.

De entre las seis pruebas de las que está compuesto el análisis VDR, nuestro laboratorio ha logrado extraer una evaluación cuantitativa de dos de ellas: los reflejos tail-lift y air-right. El reflejo de tail-lift evalúa la pérdida de la respuesta anti gravitacional una vez el animal es levantado por la cola (Ossenkopp et al., 1990). El reflejo de air-right, por contra, evalúa la capacidad anti gravitacional del animal para enderezar su cabeza en el aire cuando es soltado en posición supina (Hunt et al., 1987; Llorens et al., 1993) (Figura 132).

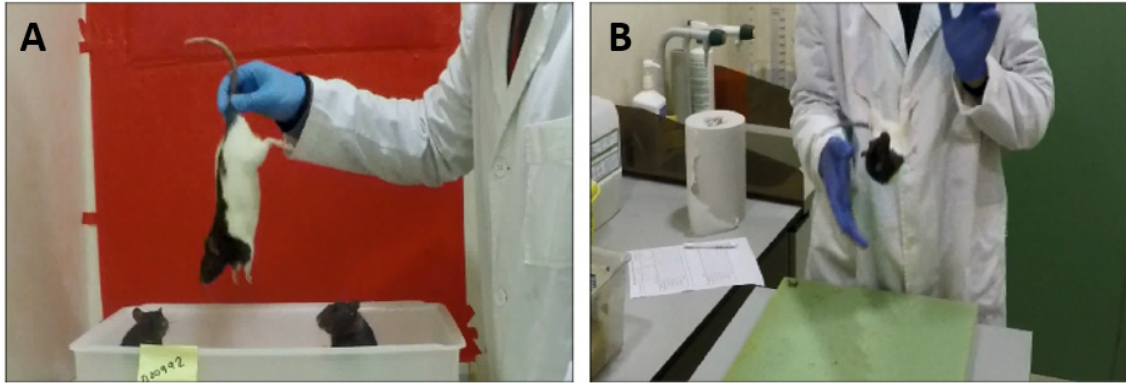


Figura 132. Imágenes propias que muestran la realización de la evaluación de los reflejos tail -lift (A) y air-right (B) en ratas.

En el reflejo de tail-lift se analiza el ángulo que forman la nariz, el cuello y la base de la cola del animal una vez es levantado. El sistema vestibular, a través la vía vestibulo-espinal, ejerce una influencia tónica sobre los músculos extensores del cuerpo y las extremidades (Wilson y Yoshida, 1968). La falta de este impulso, debido a la pérdida de la función vestibular periférica, explica la curvatura del cuerpo de las ratas al ser levantadas, y con ello, la reducción de los ángulos observados. Por lo que, contra más cerrado sea el ángulo registrado menor función vestibular tendrá el animal.

Alternativamente, en el reflejo air-right se analiza el tiempo de reacción del animal en enderezar su cabeza una vez es soltado en el aire en posición supina. El principal modulador de este reflejo es la vista, pero bajo la activación del sistema vestibular, por lo que ratas ausentes de éste pierden su capacidad de reacción (Pellis et al., 1989). En consecuencia, animales con disfunción vestibular tardarán más tiempo enderezarse o dependiendo del grado de disfunción caerán sin haberlo conseguido.

Ambos reflejos, junto al VDR, fueron evaluados en ratas con un amplio rango de disfunción vestibular a partir de videos en alta velocidad (240 fotogramas por segundo) y el programa Kinovea (Martins-Lopes et al., 2019). Los resultados revelaron una alta concordancia entre la puntuación obtenida en la batería de pruebas VDR y los ángulos de tail-lift o tiempos de air-right (Figura 133).

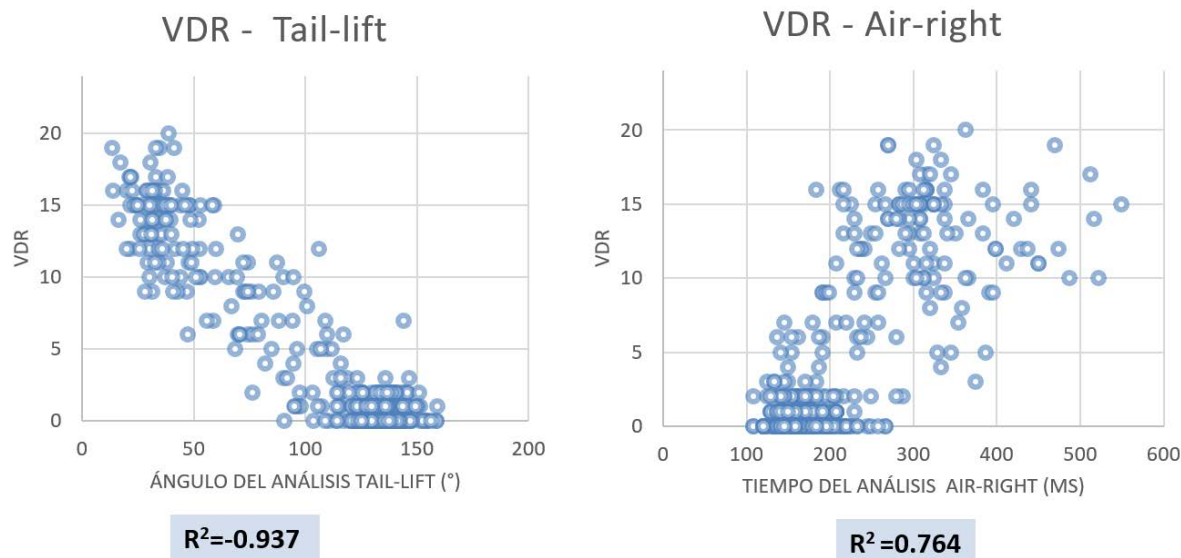


Figura 133. Análisis correlativo de los reflejos tail-lift y air-right con el sistema de puntuación VDR. Gráficas obtenidas del trabajo de final de máster de Vanessa Martins Lopes.

Los resultados demostraron que los análisis de ambos reflejos representaban medidas objetivas y cuantitativas que evaluaban la misma alteración funcional que la previamente validada batería de pruebas VDR. Esta novedosa forma de evaluación presenta las ventajas de ser una técnica sencilla de implementar, no invasiva y objetiva, que ofrece un análisis completamente cuantitativo. Además, los requerimientos en infraestructura son mínimos, ya que únicamente precisa de una cámara de video con la capacidad de grabar en alta velocidad, presente hoy en día en la mayoría de los teléfonos inteligentes.

10. Limitaciones y perspectivas de futuro en la investigación del sistema vestibular

A pesar del alto impacto que tiene la degeneración vestibular a causa del envejecimiento cada vez más generalizado de la sociedad, las técnicas de diagnóstico y tratamiento disponibles son muy limitadas.

Esto es debido, al menos parcialmente, a la carencia de recursos e investigación destinados al sistema vestibular en comparación con el coclear. Pero, además, la investigación en el vestíbulo presenta una serie de limitaciones técnicas que dificultan su abordaje.

En primer lugar, la resistencia de los roedores a los aminoglucósidos, y el limitado acceso a nivel anatómico del oído interno propicia que haya escasos modelos animales efectivos con los que recrear procesos de ototoxicidad o degeneración. Adicionalmente, el sistema vestibular es muy pequeño, y ello limita las herramientas disponibles para el análisis de muestras. Por ejemplo, el western-blot, una técnica analítica ampliamente utilizada en biología celular y molecular para la identificación de proteínas no es rentable en este sistema. Esto es debido a que es necesario utilizar una alta cantidad de muestras para disponer de la concentración proteica mínima requerida para el análisis. Por ello, las técnicas de histología e inmunodetección son una de las

principales herramientas para el estudio y manejo de este tipo de muestras.

A nivel de análisis de expresión génica existe la misma limitación técnica, la cantidad de ARN que se puede extraer de cada muestra es muy pequeña, por lo que técnicas de análisis de expresión génica como la PCR en tiempo real tampoco son rentables. En los últimos años los avances en la secuenciación masiva han permitido abaratar el coste de tecnologías como el RNA-seq, técnicas que utilizan la secuenciación masiva (NGS) para revelar la presencia y cantidad de ARN en una muestra biológica en un momento determinado (Chu y Corey, 2012; Wang et al., 2019). Esta técnica permite obtener un análisis detallado de los cambios en el transcriptoma entre distintas condiciones experimentales mediante la única inclusión de tres animales por grupo. Esto supone un gran avance en el estudio del sistema vestibular ya que permite obtener mucha información con bajo número de muestras.

Recientemente, y debido a la heterogeneidad del sistema vestibular, se están empezando a utilizar técnicas de Single-Cell RNA-Seq (Burns et al., 2015; McInturff et al., 2018). Esta variante del RNA-seq permite estudiar el transcriptoma de una célula en concreto, y con ello, analizar diferentes tipos celulares o poblaciones en distintos estadios de diferenciación.

OBJETIVOS

Esta tesis tiene dos objetivos principales. En primer lugar, pretende el abordaje del estudio de las células ciliadas de tipo I y II en el sistema vestibular mediante una aproximación funcional. Para ello se han relacionado ambos tipos celulares con dos reflejos anti gravitacionales previamente validados para la evaluación de la función vestibular en la rata.

Por otro lado, este trabajo tiene el objetivo profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la degeneración vestibular durante procesos de toxicidad crónica. Para ello, se ha continuado el trabajo realizado en el modelo de ototoxicidad crónica por IDPN en rata y se ha buscado replicar los resultados previos en nuevos modelos de toxicidad con estreptomycinina.

En este marco, la siguiente tesis engloba varios objetivos concretos:

1. Estudiar la implicación de las HCI y HCII en los reflejos tail-lift y air-right mediante el establecimiento de la relación entre el grado de pérdida funcional y los recuentos de ambas poblaciones.
2. Establecer modelos de toxicidad crónica por estreptomycinina que permitan determinar si los procesos iniciales de la degeneración vestibular replican los observados en los modelos de IDPN.
3. Analizar la relevancia del proceso de extrusión de células ciliadas en la intoxicación crónica con aminoglucósidos mediante modelos de una y dos administración de estreptomycinina al día.
4. Estudiar a nivel de expresión génica los mecanismos moleculares implicados en la degeneración incipiente por la exposición a IDPN y estreptomycinina.
5. Buscar posibles procesos degenerativos básicos de las células ciliadas mediante un estudio comparativo de los tres modelos estudiados (IDPN en rata y ratón y estreptomycinina en rata).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Lista de productos utilizados:

A) Fijadores y microscopía electrónica:

- Cacodilato (SIGMA®, C0250).
- Glutaraldehído para microscopía electrónica (SIGMA-ALDRICH®, G5882 I Electron Microscopy Sciences, 16210).
- Paraformaldehído (SIGMA-ALDRICH®, 158127).
- Tetróxido de osmio (Electron Microscopy Sciences, 19134).

B) Agentes ototóxicos:

- Alilnitrilo >98%. (Merck, Hohenbrunn bei München, Alemania).
- IDPN \geq 99%. (ACROS Organics™, 412291000) e IDPN >98% (TCI Europe, Zwijndrecht, Bélgica).
- Sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, S9137).

C) Inmunohistoquímica

Preparación de gelatina líquida para inmunohistoquímica:

- Albúmina (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche, 10 735 086 001).
- Sacarosa (MERCK, 1076541000).

Permeabilizadores:

- Tritón™ X-100 (SIGMA®, 93426).

Bloqueadores:

- Gelatina de pescado (Sigma-Aldrich, G7765).
- Suero de burro (SIGMA®, D9663).

Solución de montaje y protector de la fluorescencia:

- Mowiol 4-88 (SIGMA-ALDRICH®, 81381).

Bloque de agar para inmunohistoquímica en ganglio:

- Agar (Millipore, 05040).

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la tabla siguiente:

Diana	Tipo	Huésped	Proveedor	Identificador	Concentración
Calretinina	Policlonal	Conejo	Swant	7699/3H	1/500
Calretinina	Policlonal	Cobaya	Synaptic Systems	214,104	1/500
Caspr1	Monoclonal IgG1	Ratón	NeuroMab	75-001	1/400
FGF12	Policlonal	Conejo	Proteintech	13784-1-AP	1/500
KCNQ4	Policlonal	Conejo	Bechara Kachar, NIDCD, NIH	PB-180	1/1000
Miosina VIIa	Policlonal	Conejo	Proteus Biosciences	25-6790	1/400
Miosina VIIa	Monoclonal IgG1	Ratón	DSHB	138-1-s	1/100
NaK-ATPase α 3	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	SC16052	1/300
NF200	Monoclonal IgG1	Ratón	SIGMA	N52	1/1000
NF200	Policlonal	Conejo	SIGMA	N4142	1/1000
Oncomodulina	Policlonal	Conejo	Swant	OMG4	1/400
Spp1	Policlonal	Cabra	RD Systems	AF808	1/200
PSD-95	Monoclonal IgG2a	Ratón	NeuroMab	75-028	1/100
Radixina	Monoclonal IgG2a	Ratón	Novus Biologicals	H00005962-M06	1/100
Ribeye	Monoclonal IgG1	Ratón	BD Transduction Laboratoires	612044 161616	1/50
Tenascina-C	Policlonal	Conejo	Millipore	AB19013	1/200
DAPI			ThermoFisher	62248	1 μ l/ml

Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la tabla siguiente:

Fluorocromo	Rango de excitación	Diana	Huésped	Proveedor	Identificador	Concentración
Alexa	488	IgGs Cabra	Burro	ThermoFisher	A21447	1/500
Alexa	488	IgGs Conejo	Burro	ThermoFisher	A21206	1/500
Alexa	488	IgGs Ratón	Burro	ThermoFisher	A21202	1/500
Alexa	488	IgG1 Ratón	Cabra	ThermoFisher	A21121	1/500
Alexa	488	IgG2a Ratón	Cabra	ThermoFisher	A21131	1/500
Alexa	488	IgGs Cobaya	Cabra	ThermoFisher	A11073	1/500
Alexa	555	IgGs Cabra	Burro	ThermoFisher	A21432	1/500
Alexa	555	IgGs Conejo	Burro	ThermoFisher	A31572	1/500
Alexa	555	IgGs Ratón	Burro	ThermoFisher	A31570	1/500
Alexa	555	IgG1 Ratón	Cabra	ThermoFisher	A21127	1/500
Alexa	555	IgG2a Ratón	Cabra	ThermoFisher	A21137	1/500
Alexa	647	IgGs Cabra	Burro	ThermoFisher	A21447	1/500
Alexa	647	IgGs Conejo	Burro	ThermoFisher	A31573	1/500
Alexa	647	IgGs Ratón	Burro	ThermoFisher	A31571	1/500
Alexa	647	IgG1 Ratón	Cabra	ThermoFisher	A21240	1/500
Alexa	647	IgG2a Ratón	Cabra	ThermoFisher	A21241	1/500
Dylight	405	IgGs Conejo	Cabra	ThermoFisher	35550	1/100

D) Solución crioprotectora

- Etilenglicol ≥99% (SIGMA-ALDRICH®, 293237).
- Glicerol ≥99.5% (SIGMA-ALDRICH®, 49770).

E) Técnicas de biología molecular

Extracción de ARN

- RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004).

Retro transcripción

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 10400745).

qRT-PCR

- SensiFAST Probe Hi-ROX kit (Bioline, BIO-82005)
- Primers Taqman utilizados:

```
Spp1: Mm00436767_m1  
Camk1g: Mm00460641_m1  
Etv5: Mm00465816_m1  
Slc17a6: Mm00499876_m1  
Nptx2: Mm00479438_m1  
Gapdh: Mm99999915_g1
```

2. Animales

Los experimentos con animales se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal de Bellvitge. Su uso y tratamiento se llevó a cabo siguiendo la ley 1995 y el Decreto 214/1997 de la Generalitat de Catalunya, bajo la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona.

Se ha elegido la rata Long Evans como animal principal para llevar a cabo los experimentos de esta tesis por la caracterización previa de los modelos de IDPN (Sedó-Cabezón et al., 2015) y estreptomicina (Granados y Meza, 2005) en los que se utiliza esta cepa.

Se utilizaron grupos de ratas Long-Evans macho de 225-249g para los estudios con IDPN y machos y hembras de 21 días de edad para los de estreptomicina. Todas las ratas se obtuvieron del proveedor comercial JANVIER.LABS (Le Genest-Saint-Isle, Francia).

En algunos experimentos también se utilizaron ratones macho de la cepa 129S1 / SvImJ (129S1), provenientes de una colonia establecida en la Universitat de Barcelona a partir de animales previamente comprados a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.). Los ratones se utilizaron para estudios de expresión génica en los modelos de IDPN y alilnitrilo.

Una vez en el animalario, todos los animales pasaron un periodo de cuarentena de siete días para evitar una posible contaminación cruzada. Durante los experimentos, éstos se alimentaron con pienso 2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet (Harlan Laboratories) ad libitum en un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad (07:30-19:30h), a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $50\pm 10\%$. Se estabularon en grupos de 3-4 individuos por jaula Panlab S.L. tipo 1000 de polipropileno en el caso de las ratas (215x465x145h mm), y desde individualmente hasta 6 individuos por jaula Makrolon (28x28x15 cm) en el caso de los ratones.

Número de animales y tratamientos

Los experimentos agudos con IDPN se realizaron con tres lotes de ratas Long-Evans machos adultos. En el primero ($n = 24$) las ratas fueron administradas con una dosis única de 0 (grupo de control), 400 (IDPN 400), 600 (IDPN 600) o 1000 (IDPN 1000) mg / kg de IDPN, i.p., en 2 ml / kg de solución salina ($n = 6$ / grupo). En el segundo lote ($n = 25$), los animales recibieron 0, 450 (IDPN 450), 500 (IDPN 500), 550 (IDPN 550) o 600 (IDPN 600) mg / kg de IDPN ($n = 5$ / grupo). Por último, en el tercero ($n = 24$), se les administró 0, 150 (IDPN 3x150), 175 (IDPN 3x175) o 200 (IDPN 3x200) mg / kg al día de IDPN durante 3 días consecutivos ($n = 6$ / grupo).

Para el estudio de RNA-seq en el modelo de IDPN en rata, se utilizaron un total de 19 animales distribuidos en dos grupos: 7 fueron utilizados como controles y el resto fueron expuestos a IDPN en el agua de bebida a una concentración de 20mM durante 4 semanas. De todos los animales, se seleccionaron tres controles y tres tratados para el estudio RNA-seq, y el resto fueron utilizados para estudios de inmunohistoquímica.

Con el objetivo de estudiar mediante qRT-PCR la expresión génica de los genes candidatos (seleccionados previamente en estudios de RNA-seq), un total de 24 ratones 129S1 fueron expuestos a IDPN en el agua de bebida. Los ratones se distribuyeron en tres condiciones experimentales diferentes: control, 8 semanas de tratamiento con IDPN 30mM y ratones recuperación, que fueron tratados durante 8 semanas seguido de 10 semanas de recuperación. Las botellas de agua se cambiaron semanalmente y se pesaron para estimar la cantidad que los ratones ingirieron. Los ratones se evaluaron semanalmente para detectar cualquier déficit vestibular causado por la exposición. Finalmente, se les extrajo los ganglios vestibulares para su posterior extracción de ARN.

En el segundo estudio de qRT-PCR se utilizaron un total de 20 ratones 129S1. La mitad de ellos fueron expuestos a 1.2 mmol/kg de alilnitrito en 2 ml/kg de solución salina por intubación intragástrica y el resto fueron utilizados como controles.

Para la caracterización del modelo de estreptomina de una inyección diaria, se hizo uso de tres lotes de ratas Long-Evans machos y hembras de 21 días de edad ($n = 16, 32$ y 32). Éstas llegaron a la Unidad de Experimentación Animal del Campus de Bellvitge con sus madres y a los 20 días del nacimiento fueron separadas y agrupadas en cuatro animales del mismo sexo por jaula. Posteriormente, se evaluó su función vestibular y peso corporal. Las administraciones comenzaron el día 21 y para entonces, las ratas tenían un peso aproximado de entre 30 y 50 gramos.

Se utilizaron un total de 70 animales para la caracterización inicial del modelo (experimentos 1 y 2). Entre ellos, se utilizaron 48 machos y 22 hembras. De los primeros, 20 fueron control y 28 tratados y de las hembras, 9 de ellas fueron control y 13 tratadas. En el experimento 3 se utilizó un número igual de machos y hembras. La razón del desequilibrio inicial entre sexos fue que, debido a que el modelo animal propuesto en Granados y Meza. (2005) se hizo un uso exclusivo

de machos, inicialmente se buscó replicar las condiciones del estudio. No obstante, después de la primera aproximación se demostró en esta tesis la igualdad de efecto entre ambos sexos.

El primer lote de las ratas fue utilizado para empezar a caracterizar el modelo de una inyección diaria. Se utilizaron machos únicamente y éstos fueron tratados una vez al día con sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich) a una dosis de base libre de 0, 100, 300 y 500 mg/kg durante 6 semanas mediante inyección subcutánea. La estreptomicina fue disuelta en PBS, obteniendo una solubilidad correcta y un PH de 7.3. El volumen inicial utilizado fue de 10 ml/kg para asegurar la precisión de la dosis administrada, y a medida que los animales ganaron peso, se redujo hasta 2 ml/kg. La zona de inyección en los animales se alternó entre nuca y lomo para evitar la formación de granulomas.

El segundo experimento continuó con la caracterización del modelo, evaluando su ototoxicidad también en hembras. Las ratas fueron tratadas a una dosis de 0, 400 y 500 mg/kg durante 6 o 8 semanas, y siete de ellas (dos de 400 y cinco de 500) tuvieron 6 semanas de recuperación.

El tercer experimento tuvo como finalidad la realización de un estudio genético de RNA-seq. Las ratas fueron tratadas a una dosis de 0 y 500 mg/kg durante 6 semanas una vez al día.

Por último, para la caracterización del modelo de dos inyecciones diarias se utilizó un lote de 32 ratas de ambos sexos. Éstas fueron tratadas a una dosis de 0, 300, 350 y 400mg/kg dos veces al día con una separación de 8 horas entre dosis. El tiempo de administración de estreptomicina en cada grupo fue de 6, 4 y 3 semanas respectivamente.

Evaluación comportamental de los animales

Las ratas fueron evaluadas semanalmente a nivel vestibular, peso y estado de salud o bienestar general basado en el protocolo de supervisión de Morton y Griffiths (1985) adaptado a nuestros experimentos.

En roedores y otras especies de animales, la disfunción vestibular bilateral causada por ototoxicidad se evidencia en anormalidades comportamentales de carácter motor, como por ejemplo las manifestadas con IDPN (Delay et al., 1952). Para evaluar la disfunción se utilizaron las medidas de dos reflejos vestibulomotores anti-gravitatorios: el reflejo de aterrizaje durante el levantamiento por la cola (tail-lift) y el reflejo de enderezamiento en el aire (air-right). Las pruebas fueron grabadas mediante video de alta velocidad a cámara lenta (240 fotogramas por segundo) para su posterior análisis.

En la prueba de tail-lift, la rata se agarra por la base de la cola, se levanta de forma rápida y suave hasta aproximadamente 40 cm y luego se baja hasta el punto de partida. Los animales sanos exhiben un reflejo de extensión del tronco y extremidades para el aterrizaje sobre las patas delanteras. La pérdida de función vestibular provoca, en cambio, una pérdida de este reflejo extensor, y los animales presentan una curvatura ventral y un aterrizaje sobre el codo o el dorso. Como resultado, se obtienen unos ángulos más cerrados en el posterior análisis (Hunt et al., 1987; Pellis et al., 1991). En el reflejo de air-right, la rata se mantiene con las manos en posición supina a aproximadamente 40 cm de altura y se suelta de forma súbita para caer finalmente sobre un cojín de espuma. Los animales sanos exhiben un rápido enderezamiento en el aire y aterrizaje sobre las cuatro patas. En contraposición, las ratas que han perdido la función vestibular no son capaces de enderezar su cabeza una vez soltadas en el aire. La Figura M1 muestra el análisis por video de ambos reflejos en ratas con una pérdida evidente de la función vestibular.

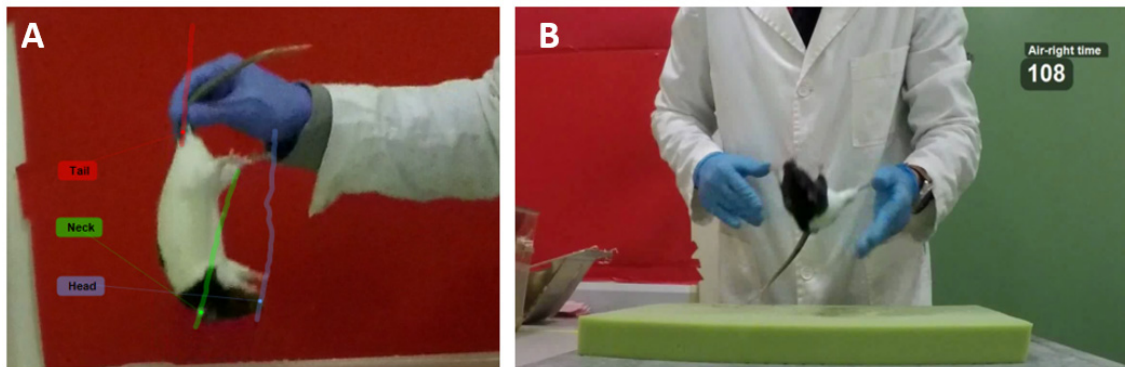


Figura M1. Análisis de los reflejos tail-lift y air-right en ratas con pérdida funcional vestibular. A: Curvatura ventral de la rata al ser levantada en el reflejo tail-lift. B: Incapacidad de la rata para enderezarse en el aire una vez es soltada en el reflejo air-right.

3. Disección vestibular

El primer paso de la disección vestibular consistió en anestesiarse las ratas con Ketamina (IMALGENE® 1000) 90mg/Kg y Xilacina (Rompún®) 10mg/Kg por vía intraperitoneal y posteriormente se decapitaron. A continuación, y trabajando a partir de entonces en la campana de extracción de gases, se sumergieron los huesos temporales en solución fijadora fría, y se hizo la disección del aparato vestibular, obteniendo tres crestas, un utrículo y un sáculo en cada uno de los dos hemisferios.

El hemisferio utilizado para microscopía electrónica (SEM y TEM) se diseccionó en solución fijadora de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M a pH 7.2. El hemisferio utilizado para inmunohistoquímica, en cambio, se diseccionó en solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS).

Una vez finalizada la disección, los tejidos se fijaron durante 1 h adicional y fueron transferidos a una solución crioprotectora (34.5% de glicerol, 30% etilenglicol, 20% de PBS, 15.5% de agua destilada). Finalmente, se almacenaron a una temperatura de -20 °C hasta su posterior procesamiento (con una aclimatación previa a 4°C durante 2 h para que la solución crioprotectora impregne el tejido en su totalidad y con ello, se evite la congelación).

NOTA: En los casos en los que se utilizaron los epitelios y ganglios para extracción de RNA, la disección se hizo en PBS y sobre de una placa helada para mantener baja la temperatura. Después de la disección, los tejidos se introdujeron inmediatamente en eppendorfs y fueron congelados en nitrógeno líquido, seguido de su almacenamiento a -80°C.

4. Protocolos utilizados

- Tampón cacodilato 0.2M (Cantidad para 400ml)

Pesar 17.46 gramos de cacodilato (SIGMA®, C0250) en un vaso de precipitados y enrasar a 400ml con agua destilada miliQ.

- Tampón cacodilato 0.1M con 1% de glutaraldehído (cantidad para 300ml)

Añadir debajo de la campana:

- 1) 150ml de tampón cacodilato 0.2M
- 2) 504µl HCl 5N
- 3) 120 agua filtrada Milli-Q
- 4) 30 ml de glutaraldehído al 25%.

Prepararlo y utilizarlo el mismo día, ya que no se conserva de forma adecuada una vez añadido el glutaraldehído.

- Paraformaldehído 4% (cantidad para 1000ml)

Fuera de la campana de extracción:

- Dejar el frasco de formaldehído puro tumbado y cerrado unos minutos antes de pesar para reducir la cantidad de partículas en suspensión.
- Pesar 41.65 g de paraformaldehído 96% en polvo con gafas, bata y mascarilla de protección.

Bajo la campana:

- Verter 1000 ml PBS1x en un Erlenmeyer de 1000ml con un agitador magnético en el interior.
- Añadir los 41.65 g paraformaldehído 96% pesados con anterioridad a la solución.
- Poner la mezcla sobre un agitador mecánico a 90rpm y a 70°C.
- Controlar la temperatura con un termómetro para que no sobrepase los 70°C.
- Una vez se haya disuelto en su totalidad (el color de la mezcla pasa de blanco a transparente), filtrar la mezcla con un papel de filtro en el interior de un embudo de vidrio.
- Alicuotar en frascos de 50ml.
- Sellar con Parafilm y etiquetar.
- Guardar en el congelador.

- Solución crio preservadora (cantidad para 100ml)

Añadir a un vaso de precipitados:

- 1) 34.5ml de glicerol
- 2) 30ml de etilenglicol

- 3) 20ml de PBS 1X
- 4) 15.5ml de agua filtrada miliQ

Mezclar todo, transferir la mezcla a un frasco de vidrio y conservar a -20 °C.

- Tampón fosfato salino, solución madre 10x (PBS) (cantidad para 1000ml)
 - Pesar y añadir las siguientes sales a un vaso de precipitado:
 - 1) 80g NaCl
 - 2) 2g KCl
 - 3) 21.71g Na₂HPO₄·7H₂O
 - 4) 2g KH₂PO₄
 - Añadir la mezcla de sales a un frasco con 800ml de agua filtrada Milli-Q.
 - Enrasar el volumen a 1 litro con agua filtrada Milli-Q y ajustar el pH a 6.8.
 - Esterilizar la solución en autoclave (20min., 121°C, ciclo líquido).
 - Almacenar a temperatura ambiente y hacer una dilución 1/10 para obtener la solución de trabajo PBS.

- Medio de montaje Mowiol
 - Pesar 4.8g de Mowiol (polyvinyl alcohol 4-88) en un vaso de precipitados de 100ml bajo la campana.
 - Añadir 12ml de glicerol al vaso de precipitados y mezclar.
 - Agitar durante 1h, protegido de la luz (cubrir con papel de plata).
 - Añadir 12ml de agua Milli-Q y agitar durante 2h con un agitador magnético a velocidad media.
 - Añadir 12ml de Tris-HCl 0.2m (pH 8.5).
 - Calentar el vaso en baño maría (rodeado de agua a 50 °C) durante 3h, agitando ocasionalmente hasta que se disuelva completamente.
 - Hacer alícuotas y mantener a -20°C.

- Gelatina para los bloques y la inclusión de las muestras tras la inmunohistoquímica
 - Coger un Erlenmeyer de 250 ml e introducir un agitador magnético.
 - Pesar 0.49 g de gelatina en el Erlenmeyer.
 - Añadir 100 ml de PBS y agitar a velocidad media.
 - Hervir la gelatina hasta que se disuelva.
 - Dejar enfriar completamente a temperatura ambiente.
 - Añadir 30 g de albúmina (de 5 en 5 gramos, ya que tarda en disolverse).
 - Una vez disuelto, introducir 20 g de sacarosa.

- Hacer alícuotas de 5ml y guardar a -20°C.
- Bloque de agar para la inclusión de muestras en la inmunohistoquímica de ganglio (cantidad para dos unidades)
 - Pesar 1.87g de agar en un vaso de precipitados y añadir 50ml de PBS.
 - Poner un agitador mecánico y calentar la mezcla hasta que hierva.
 - Dejar hirviendo 30 minutos sin poner la estufa a la máxima potencia para evitar quemar el agar.
 - Volcar el contenido en una placa de Petri pequeña de plástico y, para evitar quemar la muestra, dejar que se enfríe hasta los 50°C antes de incorporarla.
- Protocolo de inmunohistoquímica en epitelio

Una vez realizada la disección y fijación, los epitelios se almacenaron en una solución crio preservadora a -20°C o se procesaron directamente por inmunohistoquímica. El protocolo se realizó en placas de 24 pocillos, trasladando el tejido a cada uno de ellos para las distintas incubaciones.

El primer paso del protocolo consistió en eliminar el crio preservador (en el caso que hubiera sido almacenado en éste para su conservación) mediante dos lavados con PBS de 20 minutos cada uno, a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación, los tejidos se incubaron en una solución de PBS con 4% Tritón™ X-100 durante 1 hora, a temperatura ambiente y agitación suave para la permeabilización. Seguidamente, se incubaron en una solución bloqueante de PBS con 0.5% Tritón™ X-100 y gelatina de pez al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave.

Después del bloqueo, los tejidos se introdujeron en una solución con los anticuerpos primarios, 0.1% de Tritón™ X-100 y 1% de gelatina de pez durante 24h a 4°C en agitación suave.

El día siguiente, se realizaron cuatro lavados con PBS de 10 minutos cada uno en agitación para eliminar el exceso de la solución previa. Seguidamente, se introdujeron los tejidos en una solución con anticuerpos secundarios, 0.1% de Tritón™ X-100 y 1% de gelatina de pez durante 24h a 4°C, en agitación suave y tapados con papel de plata para proteger la fluorescencia.

Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados con PBS de 10 minutos cada uno en agitación para eliminar el exceso de la solución anterior.

En el caso de utilizar DAPI para la visualización de los núcleos, se incubaron las muestras en 200µl de DAPI a una concentración de 1µl/ml en oscuridad, temperatura ambiente y sin agitación durante 15 minutos. Seguidamente, se realizaron tres lavados, el primero de ellos con metanol y los siguientes con PBS, de 5 minutos cada uno y en agitación.

Para el análisis de los epitelios enteros, llegados a este punto del protocolo, se procedió a su montaje en un portaobjetos con una gota de Mowiol 4-88, y verificando con una lupa que el tejido se encontraba totalmente extendido. Por último, se dejaron secar 24 horas a 4°C en oscuridad antes de la observación.

Alternativamente, para el análisis de secciones de tejido, las muestras se transfirieron a gelatina líquida durante 24 horas a 4°C, sin agitación y tapadas con papel de plata para proteger la fluorescencia.

Al día siguiente, con todos los reactivos en hielo y debajo de la cabina extractora de gases, se introdujo una base de gelatina + 9% de solución de glutaraldehído al 25% en un molde circular de 1.5cm de diámetro y se dejó solidificar durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se retiró el epitelio vestibular de la gelatina líquida y se colocó en el centro de la superficie de gelatina solidificada, orientando correctamente la muestra: las crestas en posición lateral y los utrículos y sáculos planos, con la cara apical del epitelio expuesta hacia arriba.

Con un trozo de papel se retiró el exceso de gelatina líquida que pudiera haber quedado alrededor de la muestra, con cuidado de no tocar el tejido. A continuación, los epitelios se recubrieron con gelatina + 9% de solución de glutaraldehído al 25% y se dejaron solidificar durante 45 minutos (Figura M2).

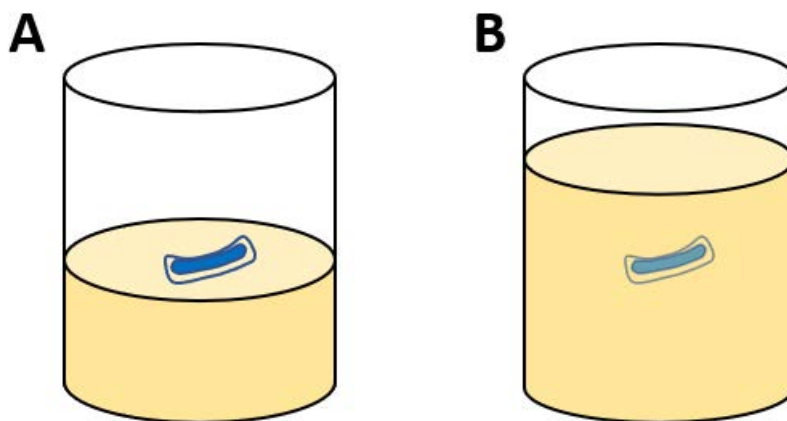


Figura M2. Representación del posicionamiento de los tejidos en las capas de gelatina. A: Vista lateral de la cresta en la primera capa del bloque de gelatina. B: Vista lateral del recubrimiento de la muestra con la segunda capa de gelatina.

A continuación, se piramidaron los bloques para conocer a posteriori la orientación del tejido y finalmente, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS ON a 4°C para un mayor endurecimiento.

En el momento de seccionar el tejido, el bloque de gelatina se enganchó con Loctite (Super Glue-3) sobre la base del vibrátomo (Leica VT 1000M) en posición vertical para realizar cortes transversales de 40µm (Figura M3).

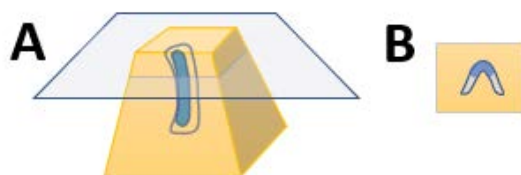


Figura M3. A: Esquema de dirección de los cortes transversales en el bloque piramidal. B: Representación de uno de los cortes del bloque.

Finalmente, los cortes se montaron con Mowiol 4-88, y fueron extendidos bajo la lupa con ayuda de un pincel. Se dejaron secar 24 horas a 4°C y en oscuridad antes de su observación.

- Inmunohistoquímica en ganglio

El primer paso del protocolo consistió en realizar dos lavados con PBS 1x durante 20 minutos y en agitación para eliminar el crio preservador. A diferencia del protocolo anterior, donde se realizó todo el proceso de marcaje con el tejido entero y posteriormente se seccionó, en ganglio se siguió el proceso inverso.

Una vez eliminado el crio preservador, se realizó la inclusión de la muestra en agar líquido y previamente atemperado (50°C). Seguidamente, y una vez el agar se solidificó por completo, se cortó el bloque en forma de pirámide para conocer posteriormente la orientación del tejido.

El bloque de agar con la muestra en su interior se enganchó con Loctite (Super Glue-3) sobre la base del vibrátomo (Leica VT 1000M) en posición vertical para realizar cortes transversales del ganglio. Se hicieron secciones de 30µm, y cada una de ellas se trasladó a un pocillo con PBS 1X de una placa de 24.

A continuación, las secciones se incubaron durante 90 minutos en una solución de PBS con 0.5% Tritón™ X-100 y 20% de suero de burro a temperatura ambiente y en agitación suave para la permeabilización y bloqueo.

En el siguiente paso se realizó la incubación del tejido en la solución de anticuerpos primarios, 0.1% de Tritón™ X-100 y 1% de suero de burro durante 24h a 4°C en agitación suave.

Al día siguiente, se hicieron cuatro lavados con PBS de 10 minutos cada uno y en agitación para eliminar el exceso de la solución anterior. Seguidamente, se incubaron los tejidos con los anticuerpos secundarios, 0.1% de Tritón™ X-100 y 1% de suero de burro durante 24h a 4°C en agitación suave y tapados con papel de plata para proteger la fluorescencia.

Finalmente, se realizaron cuatro lavados con PBS de 10 minutos cada uno y, por último, se montaron las secciones en un portaobjetos con una gota de Mowiol 4-88. Se dejaron secar 24 horas a 4°C en oscuridad antes de observarlas.

- Microscopía electrónica

En la microscopía electrónica fue necesario que los tejidos vestibulares estuvieran libres de posibles membranas u otocónias que pudieran entorpecer su posterior visualización, por lo que éstos se limpiaron de forma meticolosa. A continuación, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M a pH 7.2 a 4°C durante una noche.

De los cinco epitelios vestibulares de cada hemisferio, se utilizaron: dos crestas, el utrículo y el sáculo para microscopía electrónica de barrido (SEM) y la cresta restante para microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Al día siguiente, los tejidos se limpiaron con tampón cacodilato (dos lavados de 5 minutos cada uno), se volvieron a fijar con tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato durante 1h, se limpiaron con el mismo tampón (dos lavados de 5 minutos cada uno), y se dejaron en alcohol a 70°C hasta su posterior procesado para SEM o TEM.

- Microscopía electrónica de barrido

Los epitelios fijados con tetróxido de osmio se encapsularon en un pequeño vial cilíndrico cerrado por dos membranas porosas: una de 0.22µm (MERCK Millipore, FGLP01300) en un extremo y una de 0.8µm (Whatman®, 7060-1308) en el otro, que permitían la difusión del agua y el etanol para poder llevar a cabo el proceso de deshidratación.

Se deshidrataron las muestras con concentraciones crecientes de etanol; dos veces con alcohol 96° y tres con alcohol 100°, de 30 minutos cada una. Al día siguiente se procedió a secar los tejidos mediante un secador de punto crítico Polaron 3000, que utiliza CO₂ líquido.

Finalmente, se montaron sobre un soporte circular y fueron recubiertas con 5nm de oro o carbono. Las muestras se guardaron al vacío hasta su observación en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 7001F de la Unidad de Microscopía Electrónica del CCiTUB de la Facultad de Medicina.

- Microscopía electrónica de transmisión

Los tejidos que se utilizaron para microscopia electrónica de transmisión se introdujeron en resina epoxi (Epon o Spurr) en la Unidad de Microscopía Electrónica del CCiTUB de la Facultad de Medicina.

Posteriormente se piramidaron los bloques de resina solidificada, se realizaron secciones transversales de 1µm en crestas, utrículos o sáculos con el microtomo Reichert-JUNG 366454 (LEICA MICROSISTEMAS, S.A.), se tiñeron con azul de toluidina 1% y se examinaron en el microscopio óptico Jenalumar.

A continuación, una vez seleccionada la zona de observación, se realizaron los cortes ultrafinos y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo en la Unidad de Microscopía Electrónica del CCiTUB de la Facultad de Medicina.

Finalmente, las muestras fueron examinadas con el microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 a 75-80 kV de la Unidad de Microscopía Electrónica del CCiTUB de la Facultad de Medicina.

- Extracción de ARN, retro transcripción y qRT-PCR

El ARN se extrajo con el kit Qiagen RNeasy Mini, siguiendo los pasos del protocolo e incluyendo el carrier RNA para maximizar la concentración de ácido nucleico extraído.

Las muestras se cuantificaron con Agilent Bioanalyzer 2100 y aquellas con un RIN de 7 o superior se procesaron posteriormente para qRT-PCR. Las que se utilizaron para estudios de RNA-seq precisaron de un RIN superior a 8.

Se retro transcribieron cantidades iguales de ARN total utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, 10400745).

Para el análisis de qRT-PCR se utilizó el gen fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) como control endógeno y la qRT-PCR se realizó con el kit SensiFAST Probe Hi-ROX (Bioline, Barcelona, España).

Se hicieron triplicados para cada muestra y los primers utilizados fueron del tipo Taqman (Life Technologies, Alcobendas, España).

- RNA-sequencing (RNA-seq)

Para el análisis de RNA-seq se entregó el ARN (RIN > 8) de ganglio y epitelio vestibular por separado de tres animales tratados y tres animales control al Centro de Análisis Genómico (CNAG, Barcelona, España). Las bibliotecas se hicieron a partir de preparaciones de ARNm poliadeniladas, y se secuenciaron a una profundidad de ≥ 40 millones de paired-end reads y longitudes de 2x75 pares de bases.

A partir de los resultados obtenidos se llevaron a cabo análisis bioinformáticos en los que se incluyen análisis de ontología genética y de enriquecimiento para asociar los cambios de expresión con posibles vías moleculares implicadas. También se buscaron tanto los puntos en común como las divergencias existentes entre los distintos modelos de toxicidad estudiados.

5. Confocal y su configuración para la visualización de las muestras

Las preparaciones se observaron en los microscopios confocales Leica TCS-SL y Carl Zeiss LSM 880 de la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada del CCiTUB del Campus de Bellvitge (Figura M4).

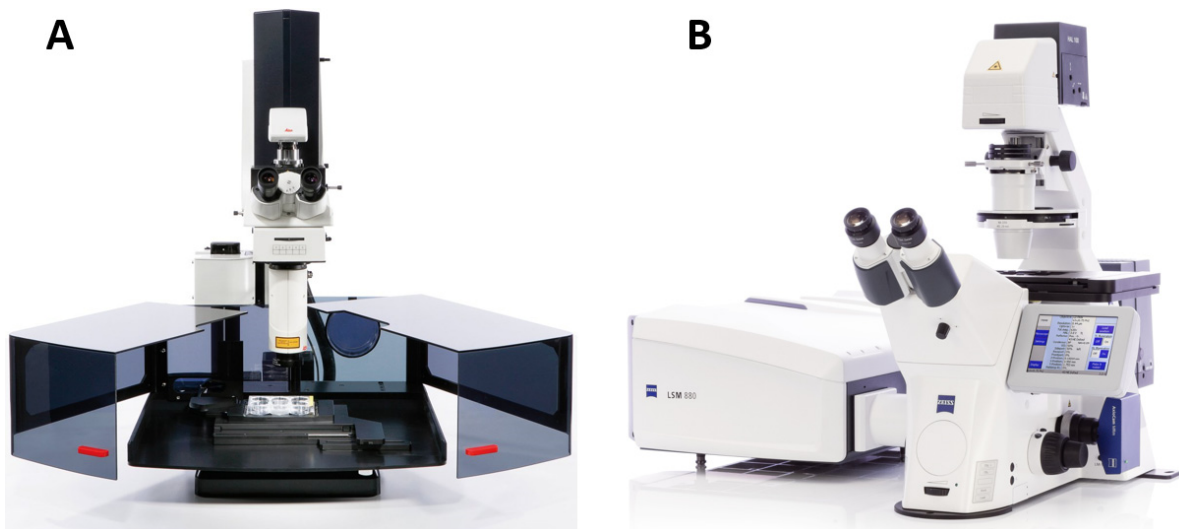


Figura M4. Imagen de los microscopios de fluorescencia confocal Leica TCS-SL (A) y Carl Zeiss LSM 880 (B).

La configuración empleada en la observación y adquisición de la mayoría de las imágenes fue la siguiente:

Objetivo: 63X
Zoom: 2
Series: 25 μ m
Secciones: 0.5 μ m

En el caso de visualizar tejidos enteros, el grosor de la serie de imágenes coincidió con el total del tejido de la preparación.

En el análisis de puntos sinápticos, el grosor de las secciones se redujo a 0.3 μ m para aumentar la precisión del estudio.

Obtención de imágenes para el análisis cuantitativo

Los ajustes de los diferentes láseres de excitación (488, 555 y 647) se establecieron en base a los individuos control y se mantuvieron para los individuos tratados y recuperación. Esto permitió tener valores de fluorescencia comparables y cuantitativamente analizables.

6. Análisis de fluorescencia

Análisis de fluorescencia mediante ImageJ

Las series de imágenes obtenidas en microscopía confocal son de gran grosor por lo que, a la hora de analizarlas, fue necesario dividir las imágenes en imágenes más finas mediante la función Z Project. Para ello, se introduce (en ImageJ por ejemplo) el punto donde empieza y acaba la sección de la imagen que se quiere analizar. En esta tesis se han realizado proyecciones de 3 μ m sobre un grosor total de 25 μ m. Esto ha permitido distinguir y cuantificar con precisión las diferentes proteínas estudiadas. Para el análisis de fluorescencia de las diferentes proteínas se analizaron un mínimo de 30 células por animal. Con el objetivo de comparar la intensidad de fluorescencia de los distintos marcajes se obtuvieron medidas arbitrarias en una región de interés de 100 μ m² (Figura M5).

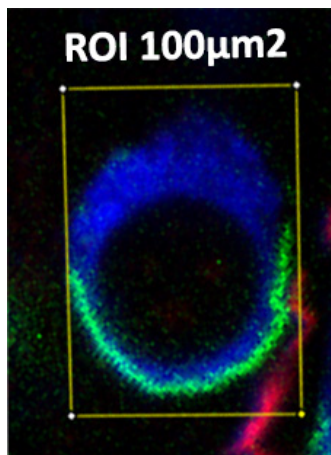


Figura M5. Representación de la región de interés (ROI) de 100 μ m² utilizada para cuantificar la fluorescencia.

Para el recuento celular, se realizó la reconstrucción 3D del tejido mediante el programa Imaris y posteriormente se procedió al recuento de cada población de células mediante el contador de ImageJ. En la Figura M6 se ilustra cada una de las zonas de los epitelios vestibulares que se utilizaron en los recuentos de células.

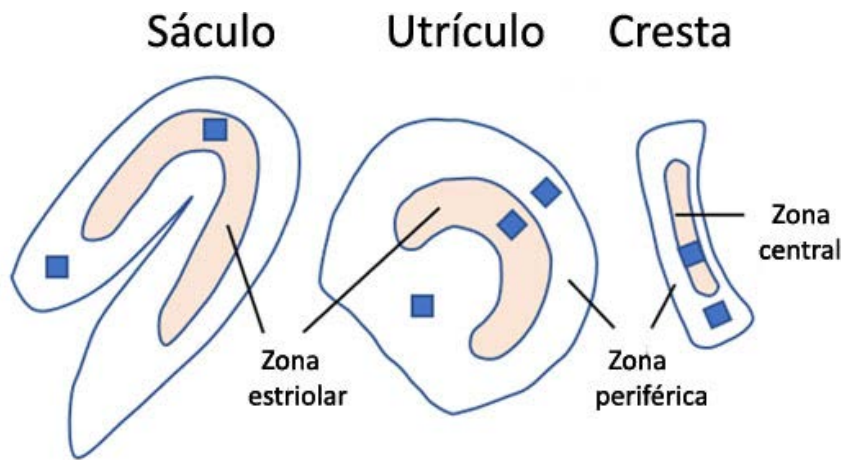


Figura M6. Representación de cada tejido del sistema vestibular donde aparecen las zonas centrales marcadas en color rosado (estriolar en el caso del utrículo y sáculo). Se representa a partir de cuadrados el área aproximada que se utilizó para tomar las distintas imágenes y el recuento celular posterior. Estas zonas han sido las siguientes: cresta central, periferia de la cresta, zona estriolar del utrículo, periferia externa del utrículo (lateral), periferia interna del utrículo (medial), zona estriolar del sáculo y periferia del sáculo. Imagen de Maroto et al., 2021.

Análisis de las sinapsis

El análisis de las sinapsis se realizó con el programa Imaris, basado en un enfoque semiautomático para facilitar el recuento y reducir posibles sesgos.

Para distinguir las sinapsis entre HCI y HCII, fue necesaria la segmentación previa de cada tipo celular. Esto se realizó con la función “cell” en el modo de visualización 3D. El reconocimiento de las células se basó en los canales de fluorescencia con un marcaje citoplasmático y en su diámetro. A partir del reconocimiento de cada tipo celular se generaron nuevos canales filtrados con la fluorescencia asociada únicamente a la población seleccionada.

Una vez efectuada la segmentación, para el análisis de los puntos fue necesario cuantificar el diámetro de éstos con la herramienta de medición en la modalidad de visualización 2D. Los valores obtenidos se introdujeron posteriormente como parámetros en el programa para facilitar la detección. A continuación, se utilizó la función “spot” dentro de las funcionalidades 3D. Ésta identifica los puntos sinápticos basándose en los diámetros esperados (medidos previamente) para cada canal de fluorescencia (Figura M7). La detección de puntos se puede optimizar aún más ajustando el umbral de detección a partir del cual son reconocidos por el programa. Una vez configurados, los parámetros de adquisición se mantuvieron durante el resto del experimento para evitar sesgos durante el análisis.

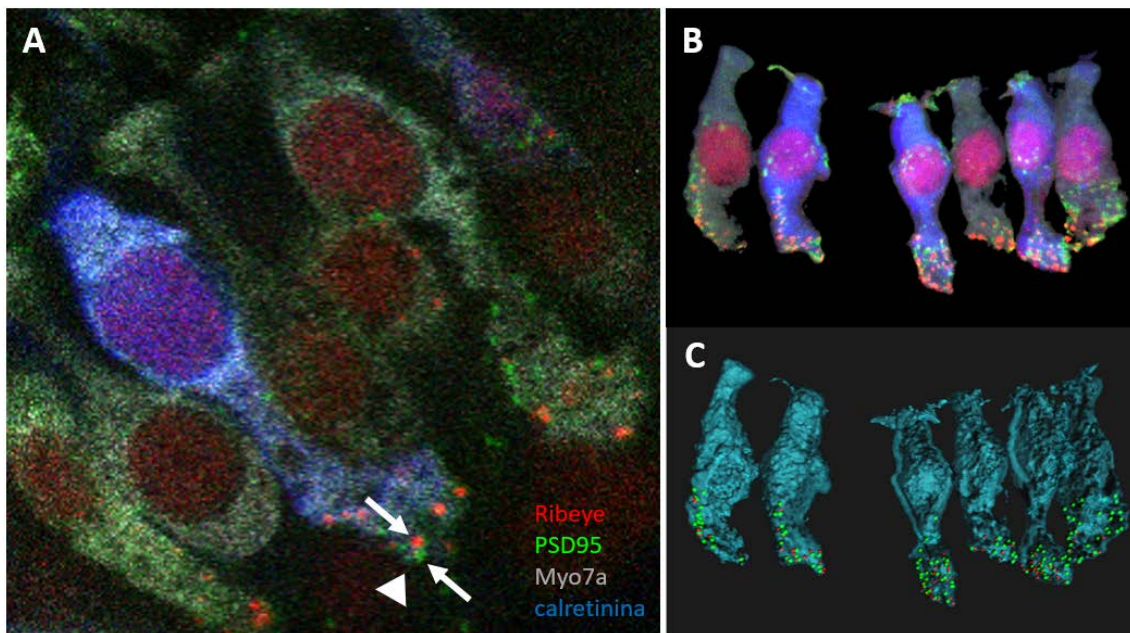


Figura M7. A: Imagen de inmunohistoquímica de las densidades pre y post sinápticas marcadas con Ribeye (en rojo) y PSD95 (en verde) respectivamente en una célula ciliada de tipo II identificada con calretinina (en azul). B: Células ciliadas de tipo II filtradas con el programa Imaris. C: Reconocimiento final de los puntos sinápticos.

7. Análisis de comportamiento y grabación de video

Se grabaron los reflejos air-right y tail-lift a cámara lenta a 240 fotogramas por segundo (fps) con la cámara GoPro Hero 5. Las grabaciones se realizaron delante de un fondo rojo para facilitar el análisis posterior y se les colocó a los animales un collar de goma elástica con una bolita blanca para identificar objetivamente la parte posterior del cuello.

Una vez obtenidos los videos, el análisis se efectuó con el programa de libre acceso Kinovea. Pero antes de empezar el análisis, fue necesaria una configuración inicial del programa. Por defecto, el software interpreta que se están utilizando videos a velocidad estándar (30 fps), al tratarse en nuestro caso de videos en cámara lenta, los tiempos debieron ajustarse a 240 fps. Este parámetro puede modificarse en una de las pestañas superiores de configuración: Movimiento> Especificar la velocidad de origen. Y cuando se haya cambiado el número, aplicar los cambios.

También fue necesario cambiar la representación de tiempo predefinida a milisegundos mediante: Opciones> Formato de marcas de tiempo>Total en milisegundos.

A continuación, se calibraron las distancias físicas del video para relacionar los píxeles con una unidad de medida correcta. Para hacerlo, se dibujó una línea (con la opción trazar línea en la barra de herramientas) sobre un segmento del video de longitud conocida. Una vez trazada, se pulsó el botón derecho del ratón con el cursor sobre ella y se seleccionó calibrar. Finalmente, se escribió la medida real del segmento elegido.

Las calibraciones de velocidad, representación de tiempo y distancia, se guardan en el programa para todos los vídeos que se procesen hasta su cierre.

El último paso en la configuración consistió en ubicar el origen del sistema de coordenadas de referencia para el análisis. Para ello, seleccionar en el menú superior: Imagen> Origen del sistema de coordenadas. Finalmente, éste se coloca en el lugar deseado (en nuestro caso en el límite superior izquierdo de la caja del animal) y se aplica la configuración (Figura M8).



Figura M8. Ajuste del sistema de coordenadas en el análisis de tail-lift en el programa Kinovea.

Hasta aquí la configuración fue común para la evaluación de los reflejos tail-lift y air-right. Los pasos que se detallan a continuación son específicos de cada tipo de evaluación.

Análisis de tail-lift

Para evaluar el reflejo tail-lift se realizó un seguimiento de tres puntos concretos en la rata: nariz, parte posterior del cuello y base de la cola, a lo largo de todo el movimiento. Para ello, se seleccionó el marcador en cruz de la barra de herramientas y se colocó uno en cada punto. A continuación, para cada uno de ellos y con el marcador justo encima, se pulsó el botón derecho del ratón>Seguir la trayectoria. La cruz del punto se convierte entonces en una cruz con dos cuadrados concéntricos (Figura M9). Si se vuelve a pulsar el botón derecho del ratón>Configuración es posible personalizarlo un nombre, forma y color.



Figura M9. Configuración de los tres puntos de seguimiento: cabeza, cuello y cola en el programa Kinovea.

Una vez el programa detectó los tres puntos a seguir, con la rueda del ratón se avanzó el video fotograma a fotograma verificando que cada uno de ellos seguía en su lugar (encima de cabeza, cuello y cola). El programa Kinovea ofrece un seguimiento semi automático, por lo que, en determinadas ocasiones es necesario corregir la trayectoria de cada uno de los puntos a lo largo del video.

Para finalizar el seguimiento, fue necesario dirigirse a cada uno de los puntos y pulsar el botón derecho del ratón>terminar edición de la trayectoria. La mayoría de los videos ocupan mucho espacio por lo que es interesante acortarlos para conservar únicamente la parte específica del análisis. Para ello, en la barra de herramientas hay dos corchetes que realizan esta función.

Posteriormente, se guardó mediante Archivo> Guardar el video. Este modo además de guardar el video también mantiene el seguimiento realizado. Finalmente, para extraer las coordenadas de cada uno de los puntos a lo largo del tiempo, los cuales son necesarios para calcular los ángulos, se seleccionó: Archivo>Exportar hoja de cálculo>Trayectoria en texto.

Programa en R para el análisis del ángulo que forman los tres puntos seleccionados

A partir del análisis de los videos del reflejo tail-lift, se obtuvieron las coordenadas (x,y) de cada uno de los tres puntos (cabeza, cuello y cola) por cada milisegundo que dura el ascenso y descenso de la rata. Estos datos, se transfirieron a un programa informático codificado en R que calculó el ángulo que formaban cada uno de los tres puntos a lo largo de la trayectoria. De entre todos los obtenidos, se seleccionó el mínimo o más pequeño.

A continuación, se describen brevemente los cálculos que el programa realiza para calcular los ángulos. Los tres puntos de los que se ha hecho un seguimiento previo (cabeza, cuello y cola) forman dos vectores, a los que llamaremos a y b. El producto escalar de ambos está definido por:

$$a \cdot b = \|a\| \|b\| \cos \theta$$

θ es el ángulo que forman los dos vectores o de igual manera, los tres puntos de interés. Finalmente, para calcular el ángulo solo será necesario despejarlo en la ecuación:

$$\theta = \cos^{-1} \frac{a \cdot b}{\|a\| \|b\|}$$

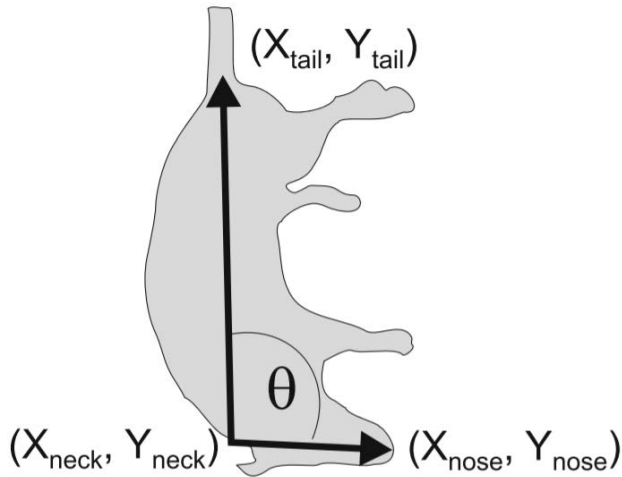


Figura M10. Representación del ángulo evaluado que forman los tres puntos (nariz, cuello y cola) en el reflejo de tail-lift (Martins-Lopes et al., 2019).

Análisis de air-right

El segundo reflejo que se ha analizado con Kinovea es el de air-right. Para la evaluación fue necesario calcular el tiempo que tardaba la rata en enderezar la cabeza una vez se la dejaba caer en el aire. El análisis se realizó mediante la opción cronómetro de la barra de herramientas. Una vez seleccionado, se colocó en la parte del video deseado haciendo clic con el ratón. A continuación, simplemente hubo que pulsar el botón derecho del ratón encima del cronómetro>Iniciar cronómetro para activarlo (Figura M11).

Por último, cuando la cabeza de la rata se enderezó totalmente, se terminó el cronometraje de nuevo haciendo clic derecho en el cronómetro>Detener el cronómetro.

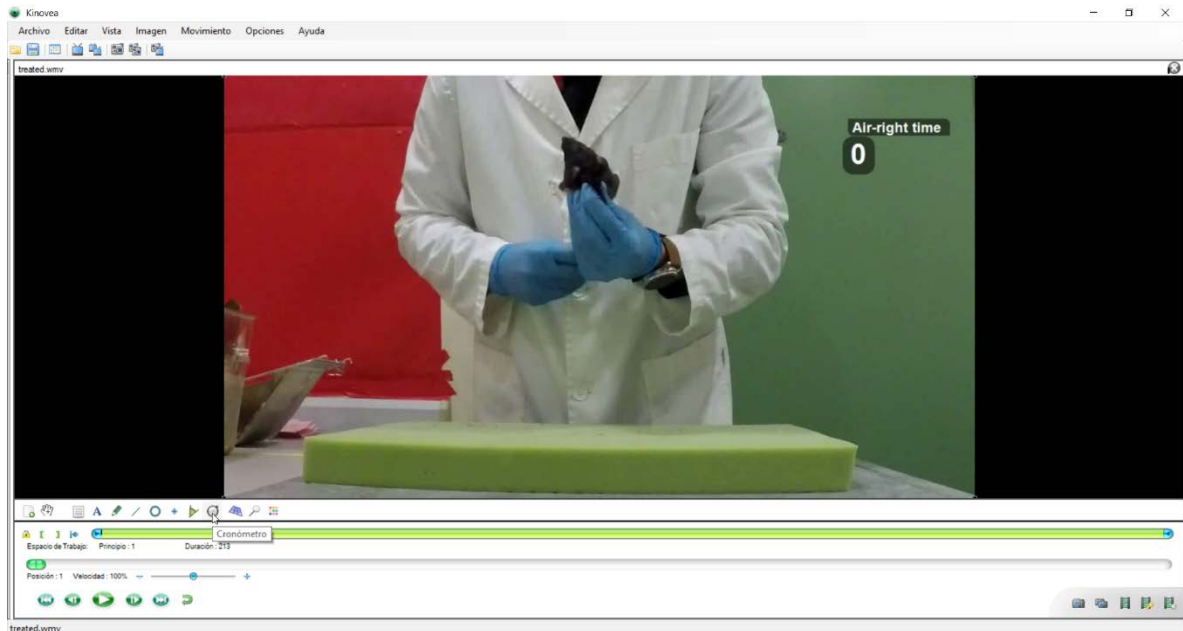


Figura M11. Función de cronómetro para en análisis de comportamiento air-right en el programa Kinovea.

8. Estadística

Los resultados que se exponen en esta tesis fueron representados a partir de la media \pm error estándar de la media de los datos. Los análisis estadísticos del peso corporal y disfunción vestibular se llevaron a cabo con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 25. Los resultados de comportamiento fueron analizados según la lambda de Wilks en la prueba de MANOVA de medidas repetidas y el nivel de significación α se situó en $p < 0.05$. En los casos que no había suficientes grados de libertad se utilizó la prueba de Greenhouse-Geiser de medidas repetidas ANOVA.

La dosis y el efecto del IDPN/estreptomina y la fluorescencia de las diferentes proteínas estudiadas se analizaron con la prueba de Duncan de ANOVA y el nivel de significación α se situó en $p < 0.05$.

Para evaluar la relación entre número de células ciliadas y alteraciones de reflejos, se establecieron dos valores límite del ángulo en el tail-lift y el tiempo en el air-right, que separaban los animales con reflejo normal, reflejo disminuido pero presente y reflejo ausente. Seguidamente, los recuentos de células de cada animal se compararon entre los tres grupos definidos por esos límites, mediante una ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de la prueba de Dunn-Bonferroni para comparaciones posteriores de los grupos dos a dos.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: RELACIÓN ENTRE LA PÉRDIDA DE CÉLULAS CILIADAS Y LA ALTERACIÓN DE DOS REFLEJOS ANTI GRAVITACIONALES EN RATA

1.1 Efectos del IDPN en el reflejo anti gravitacional tail-lift

Las ratas que fueron expuestas a IDPN presentaron efectos en el peso corporal, comportamiento espontáneo y en los reflejos anti gravitacionales tail-lift y air-right, como se ha demostrado con anterioridad en publicaciones previas (Crofton y Knight, 1991; Llorens et al., 1993; Martins-Lopes et al., 2019). La pérdida de peso corporal se hizo evidente en los días posteriores a la exposición. A pesar de esto, a partir de la semana siguiente al tratamiento, los animales volvieron a incrementar su peso.

El primer experimento incluyó ratas expuestas a 0, 400, 600 y 1000 mg / kg de IDPN. Los efectos sobre los reflejos vestibulares fueron registrados en función de la dosis y el tiempo por Anna Bellmunt dentro de su trabajo de fin de grado y han sido publicados anteriormente (Martins-Lopes et al., 2019).

Los resultados para el reflejo tail-lift fueron confirmados y ampliados en los dos siguientes experimentos, realizados totalmente dentro de la presente tesis. En uno de ellos las ratas recibieron 0, 400, 450, 500, 550 o 600 mg / kg de IDPN, y en el otro se les administró IDPN durante tres días consecutivos a 0, 150, 175 o 200 mg / kg · día.

Con el objetivo de unificar el efecto del IDPN en el reflejo tail-lift, se hizo el promedio de los ángulos mínimos desde el día 21 hasta el 91 para el primer experimento o hasta el día 28 para los dos siguientes. La progresión del daño ototóxico más allá de los 28 días ha sido documentada en estudios previos, y no existe evidencia de progresión en la pérdida celular más allá de este punto.

La disfunción vestibular provoca en la rata que se curve ventralmente y, en consecuencia, se obtienen en el análisis unos ángulos más cerrados. El Análisis ANOVA del promedio de los ángulos de tail-lift para el primer, segundo y tercer experimentos, resultaron respectivamente en $F(3, 20): 189.3$ ($p = 0.000$), $F(4, 20): 7.296$ ($p = 0.001$) y $F(3, 17): 13.44$ ($p = 0.000$) (Figura R1).

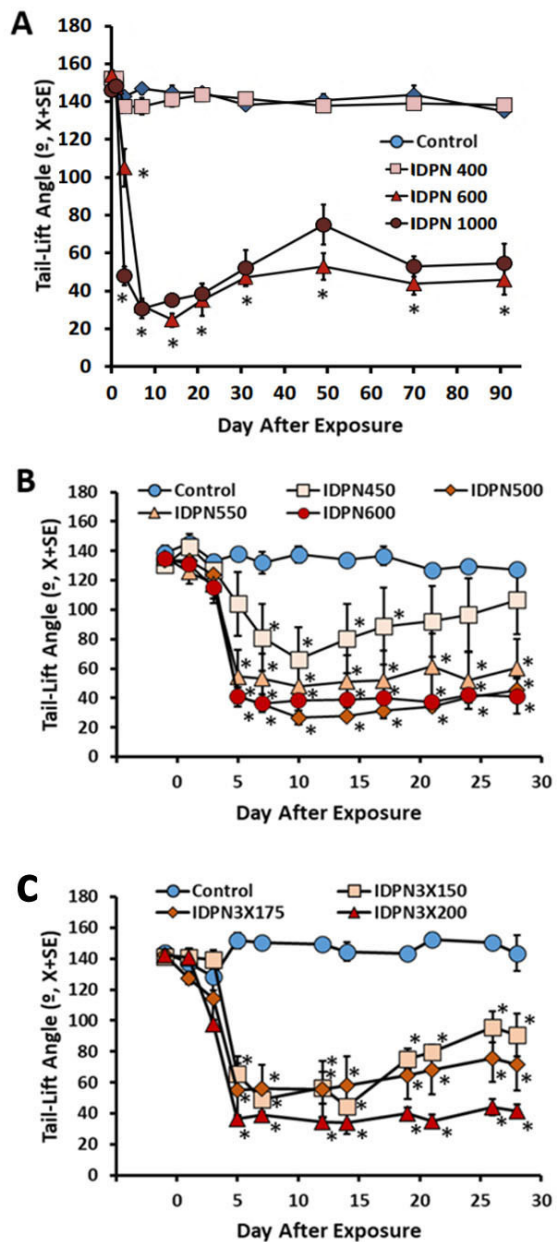


Figura R1. Efecto de la toxicidad vestibular sobre el reflejo tail-lift. Los datos se representan como la media \pm SE del ángulo mínimo formado entre la nariz-cuello-cola durante la elevación de la rata. A: Evolución temporal de la ototoxicidad aguda con IDPN, experimento 1 (0-1000mg / kg, n = 6 / grupo). B: Evolución temporal de la ototoxicidad aguda con IDPN, experimento 2 (0 - 600 mg / kg, n = 5 / grupo). C: Evolución temporal del efecto del IDPN subagudo, experimento 3 (0-200 mg / kg · día, durante 3 días consecutivos, n = 6 / grupo). *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de obtener significación en la prueba ANOVA y análisis MANOVA de medidas repetidas. El análisis MANOVA de medidas repetidas resultó en efectos significativos de Día y Tratamiento en los valores del ángulo de tail-lift registrados en el experimento 1 (Día: Lambda de Wilks: 0.058, F (9, 12): 343.9, $p = 0.000$; Tratamiento: F (3, 20): 348.3, $p = 0.000$), en el experimento 2 (Día: Lambda de Wilks: 0.070, F (10, 11): 14.60, $p = 0.000$; Tratamiento: F (4, 20): 8.89, $p = 0.000$) y en el experimento 3 (Día: Lambda de Wilks: 0.088, F (10, 8): 8.25, $p = 0.003$; Tratamiento: F (3, 17): 17.08, $p = 0.000$). Los análisis ANOVA día a día indicaron que se produjeron efectos significativos en los ángulos de tail-lift en el día 5 posterior a la exposición y todos los días posteriores en los tres experimentos (todas las F (4, 20) > 6.43, $p < 0.002$; y todas las F (3, 17) > 8.03, $p < 0.002$). Las dosis totales de 500 mg / kg de IDPN o superior provocaron una caída máxima en el ángulo el día 5 después de la exposición sin recuperación posterior. En animales tratados con una dosis aguda de 450 mg / kg, el efecto máximo se observó dos semanas después de la administración. Esto fue seguido por una recuperación significativa y el valor medio del grupo no fue significativamente diferente de la media del control cuatro semanas después de la administración. Los animales a los que se les administró IDPN3x150 presentaron cierta recuperación aparente en los valores del ángulo de elevación de la cola, pero los valores medios del grupo no se recuperaron a los valores de control.

1.2 Efectos del IDPN en los tiempos del reflejo air-right

La disfunción vestibular a causa de la exposición al IDPN provoca también un incremento en el tiempo de enderezamiento de la rata en el reflejo air-right (Martin-Lopes et al., 2019). En el tercer experimento se puede observar este incremento tiempo dosis dependiente tras las tres administraciones de IDPN. Los resultados son el promedio de los ángulos desde el día 21 hasta el final del experimento. Únicamente las ratas del primer y tercer experimento fueron evaluadas por este reflejo y el análisis ANOVA de los promedios resultó en $F(3, 20): 76.15$ ($p = 0.000$) y $F(3, 17): 7.705$ ($p = 0.002$), respectivamente (Figura R2).

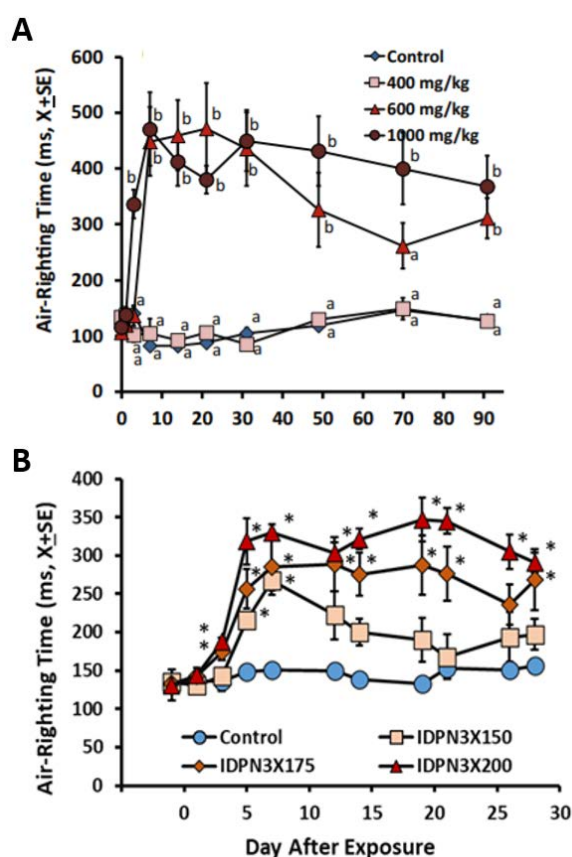


Figura R2. Efectos de la toxicidad vestibular sobre el reflejo air-right. A: Evolución temporal de la ototoxicidad aguda con IDPN, experimento 1 (0-1000mg / kg, n = 6 / grupo). B: Evolución temporal del efecto del IDPN subagudo, experimento 3 (0-200 mg / kg · día, durante 3 días consecutivos, n = 6 / grupo). Los datos corresponden a la media \pm SE del tiempo que tarda la rata en enderezar su cabeza en el aire cuando se deja caer en posición supina desde aproximadamente 40 cm por encima de un cojín de espuma. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de obtener ANOVA significativo y análisis MANOVA de medidas repetidas. El análisis MANOVA de medidas repetidas reveló efectos significativos en el experimento 1: (Día: lambda de Wilks: $F(12, 9): 61.76$, $p < 0.001$; Tratamiento: $F(3, 20): 95.84$ $p < 0.001$) y en el experimento 3: (Día: lambda de Wilks: 0.081 , $F(10, 8): 9.063$, $p = 0.002$); Tratamiento: ($F(3, 17): 12.18$, $p = 0.000$). Los análisis ANOVA día a día indicaron que en el experimento 1 hubo diferencias significativas en el tiempo de enderezamiento entre el grupo control y el grupo tratado a partir del día 3 y hasta el final del estudio con una $F(3, 20) > 9.18$ y $p < 0.001$ en todos los casos. El grupo de 1000 mg / kg se diferencia de los otros grupos a partir del tercer día, con tiempos de recuperación mayores. Del día 7 en adelante sus resultados son equivalentes a los del grupo de 600 mg / kg, así como también son equivalentes durante todo el estudio los resultados obtenidos por el grupo control y el grupo de 400 mg / kg. En el experimento 3 hubo diferencias significativas entre los grupos en todos los días entre el día 3 después de la exposición y el final del experimento (todas las $F(3, 17) > 4.58$, p 's < 0.016). Los efectos máximos se registraron el día 7 después de la exposición. Esto fue seguido por una recuperación significativa en los animales IDPN3X150, pero no en los animales IDPN3X175 e IDPN3X200.

1.3 Estudio conjunto y relación de ambos reflejos

Se puede observar en la Figura R3G la relación entre cada dato de forma individual en ambos reflejos. Todos los animales control revelaron ángulos de tail-lift y tiempos de air-right por encima de 120 grados y por debajo de 170ms respectivamente. Estos valores se adoptaron como valores umbral para diferenciar las respuestas normales de las respuestas con afectación vestibular en los posteriores análisis. Tal y como se detalla más adelante, tras la dosis de 1000mg/kg (IDPN1000) los animales mostraron una pérdida completa de células ciliadas, por lo que se utilizaron los valores de respuesta de este grupo como referencia en la ausencia total de la función vestibular.

Los efectos del IDPN en ambos reflejos fueron diferentes y los ángulos de tail-lift disminuyeron antes de que aumentaran los tiempos de air-right. Por ejemplo, 4 de los 6 animales del grupo IDPN3X150 tuvieron ángulos en el rango de afectación de 70-120, mientras sus tiempos de air-right estaban en el rango normal (por debajo de 170 ms).

Si se considera el número total de animales, solo 6 de los 69 tenían ángulos de tail-lift entre 70 y 120 grados, por lo que la mayoría de ellos podrían clasificarse por tener una respuesta vestibular normal o ausente (en función del criterio utilizado en este análisis). Menos del 10% de los animales presentaron una respuesta entre los dos límites establecidos. En el reflejo de air-right, en cambio, se pudieron encontrar 14 de las 44 ratas con tiempos intermedios de air-right (entre 170 y 350 ms), es decir, un 30% de los animales tenían un reflejo más lento de lo normal pero presente.

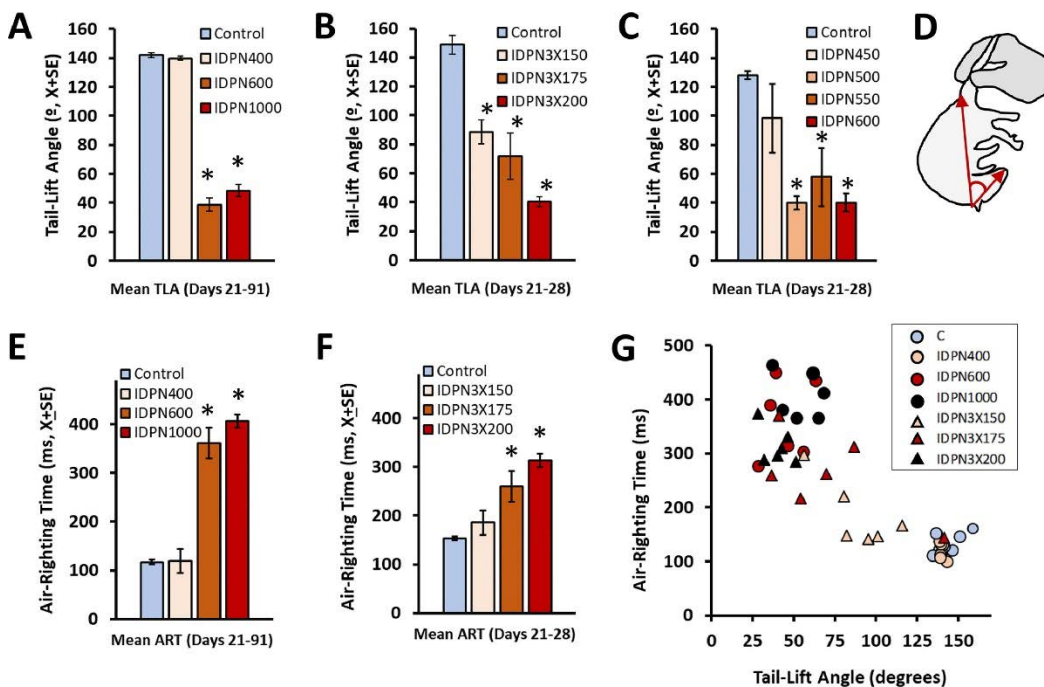


Figura R3. A-C: Efectos de la toxicidad vestibular por IDPN en el reflejo tail-lift. Los datos presentan el promedio \pm SE del ángulo mínimo formado entre la cabeza, cuello y cola de la rata al ser levantadas para los tres experimentos (A: primer experimento, B: segundo experimento, C: tercer experimento). D: Representación esquemática del reflejo tail-lift en una rata con disfunción vestibular y el ángulo formado entre los tres puntos comentados anteriormente. E-F: Efectos de la toxicidad vestibular por IDPN en el reflejo air-right. Los datos muestran el promedio \pm SE del tiempo que tardan las ratas en enderezar su cabeza cuando se dejan caer en una posición supina sobre una superficie acolchada. Los datos mostrados en las gráficas son una media entre los días 21 y 91 después de la exposición al IDPN (A y E, 0 - 1000 mg / kg, una dosis, n = 6 / grupo) o días 21 a 28 después de la exposición (B y F, 0-200 mg / kg · día, durante 3 días consecutivos: 6 / grupo y C, 0 - 600 mg / kg, una dosis, n = 5 / grupo). G: Relación entre los valores del reflejo de tail-lift mostrados en los paneles A y B con los del reflejo air-right mostrados en E y F. *: $p < 0.05$, diferencia significativa respecto al grupo control y prueba de Duncan significativa después de la prueba ANOVA.

1.4 Pérdida de células ciliadas dependiente de la dosis, zona epitelial y tipo celular después de la exposición a IDPN

El epitelio sensorial vestibular de las ratas control mostró una alta densidad de células ciliadas (Myo7a +), incluida la población de HCI (identificada por el marcaje de cálices con Caspr1 y Myo7a en el citoplasma) y HCII (con calretinina y Myo7a citoplásmicos y ausencia de cáliz). En la zona estriolar macular y central de la cresta la mayoría de las HCI fueron identificadas por las terminales que inervan únicamente cálices y que expresan calretinina. Esta forma de expresión proteica es muy diferente al de las células ciliadas de tipo II, donde es un marcaje citoplasmático, facilitando la diferenciación entre ambas.

Se ha demostrado en estudios anteriores una pérdida de células ciliadas dosis dependiente de IDPN (Llorens et al., 1993; Llorens y Demêmes, 1994; Martins-Lopes et al., 2019). La toxicidad aguda y subaguda por este nitrilo está bien caracterizada y se ha documentado que ocurre en mayor medida dentro de la primera semana después de la exposición, estabilizándose antes de las tres semanas (Llorens et al., 1993; Llorens y Demêmes, 1994; Seoane et al., 2001a). Las muestras analizadas presentaron, en consecuencia, un estadio en el que la lesión estaba estabilizada.

Las ratas que recibieron una dosis aguda de 400mg/kg tenían una apariencia en cuanto a densidad celular similar a los controles, mientras que las ratas que recibieron la dosis de 1000mg/kg mostraron una ausencia total de células ciliadas a excepción de algunas de tipo II en el sáculo (Figura R4).

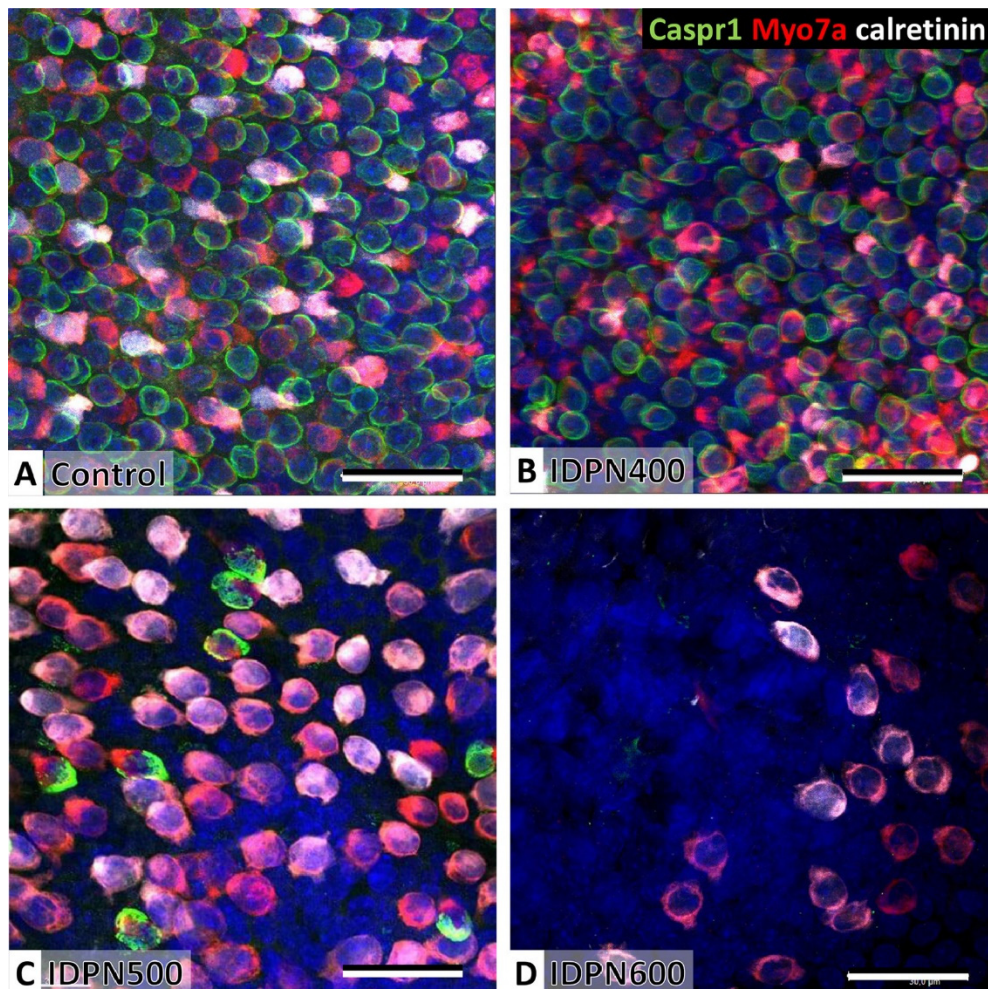


Figura R4. Efecto en la densidad de células ciliadas (HCs) tras la exposición con IDPN. Las imágenes mostradas a modo de ejemplo corresponden a la zona medial del utrículo, en la periferia respecto a la estriola. Las células ciliadas de tipo I (HCI) se caracterizan por la presencia de Caspr1 en la cara interna de la terminal caliciar (marcada en verde). Las células ciliadas de tipo II (HCII) se pueden distinguir por la presencia de calretinina (marcada en blanco) en el citoplasma además de Myo7a (marcada en rojo). Los núcleos fueron identificados con DAPI (azul). Las imágenes mostradas son proyecciones de un stack de capturas mediante microscopía confocal y optimizadas para representar la densidad celular. Las células que parecen ser Myo7a+, Caspr- y calretinina- pueden ser HCII que expresan calretinina a niveles bajos o HCI con su unión calicial en planos no incluidos en la imagen. Para el recuento de células, ya que se utilizó un stack igual al grosor del tejido, las distintas poblaciones celulares fueron propiamente diferenciadas. A: Densidad normal de células en ratas control. B: Se encontró una apariencia similar al control en la mayoría de las ratas que recibieron la dosis más baja de IDPN (400 mg / kg). C: Pérdida manifiesta de HCI y HCII en una rata a la que se le administró 500 mg / kg de IDPN. D: Pérdida completa de HCI y gran pérdida de HCII en una rata que recibió una dosis de 600 mg / kg de IDPN. Barras de escala: 20 μ m.

Los recuentos se realizaron a partir de los marcajes de Caspr1, calretinina y Myo7a para identificar las células ciliadas de tipo I, II y el total de células ciliadas respectivamente. Los recuentos se obtuvieron de los tres epitelios sensoriales del sistema vestibular: cresta, utrículo y sáculo. Adicionalmente, de cada epitelio se analizaron de forma independiente la zona periférica (periferia distal y lateral en el caso del utrículo) y estriolar/central.

Los datos histológicos y comportamentales de los animales de los tres experimentos se analizaron como uno solo. Se observaron efectos significativos en el número de células a causa del tratamiento en las 21 pruebas de ANOVA (realizadas en función del tipo celular y zona, todas $F(9, 53-59) > 7.98$, p 's: 0.000), pero los distintos epitelios y tipos celulares reaccionaron de forma diferente al tóxico. Por ejemplo, las células ciliadas de tipo I (Figura R5) mostraron una mayor sensibilidad al IDPN que las de tipo II (Figura R6) y en el sáculo se registró una densidad de células de ambos tipos mayor al del utrículo y cresta al incrementar las dosis de IDPN. Por ejemplo, el número de células de tipo II en la periferia del sáculo solo se redujo después de la dosis más alta (1000mg/kg), mientras que en la zona estriolar del utrículo hubo una disminución significativa del 33% de las HCI en la dosis más baja (400 mg / kg).

Los recuentos del número total de células ciliadas, marcadas con Myo7a, no se obtuvieron sumando ambas poblaciones de células ciliadas, sino que se realizó un recuento independiente a partir de este marcador citoplasmático (Figura R7).

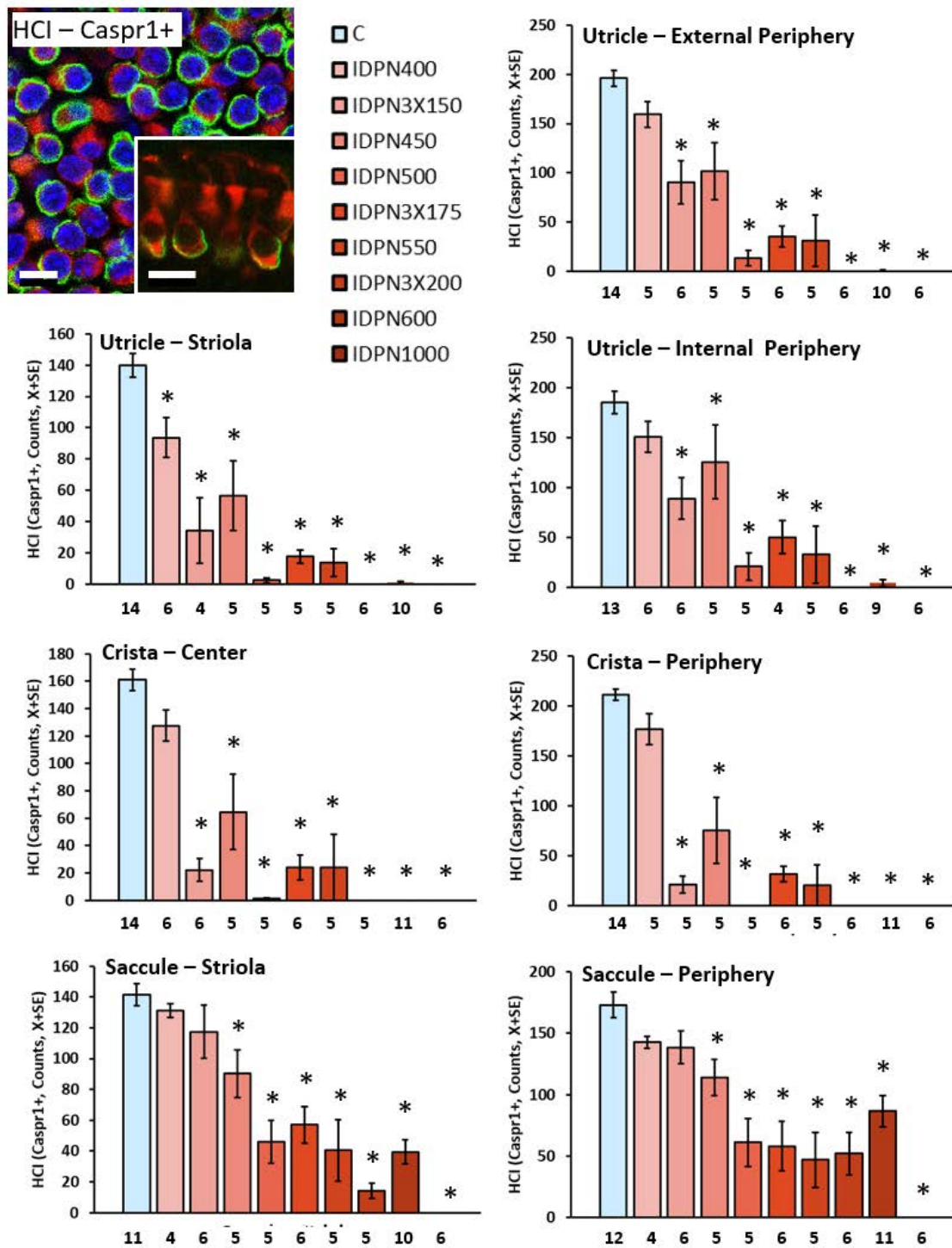


Figura R5. Diferencias en la pérdida de células ciliadas tipo I (HCl) después de la exposición a IDPN, datos mostrados en función de la dosis (400 a 1000 mg / kg, ver leyenda), zona (central / estriola vs periferia) y epitelio vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes del margen superior a la izquierda muestran el marcaje con Myo7a (rojo) y Caspr1 (verde) para identificar la población de HCl. Barras de escala: 10 μ m. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCl ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y la dosis de IDPN. Los números debajo de las barras indican el número de animales. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

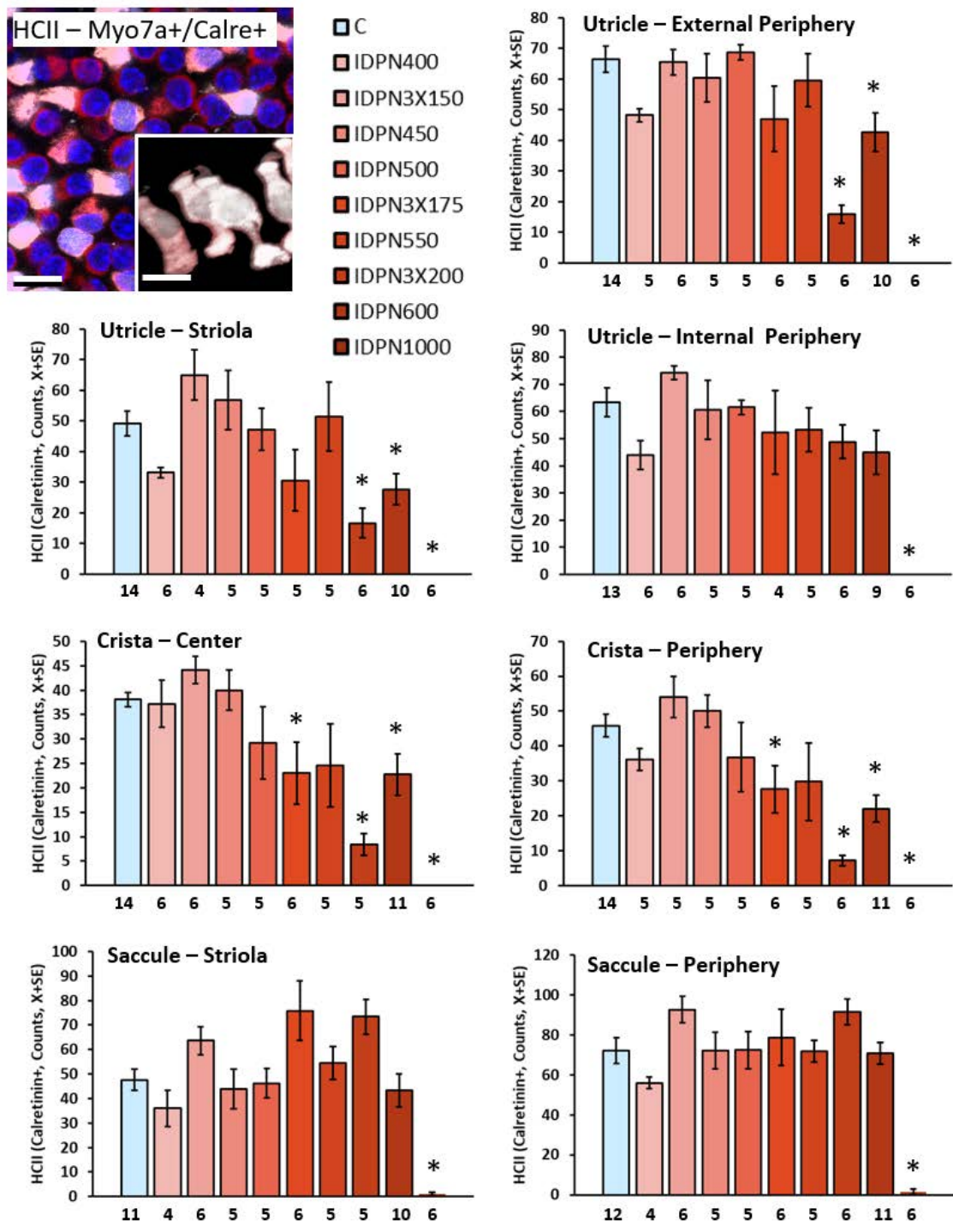


Figura R6. Diferencias en la pérdida de células ciliadas tipo II (HClI) después de la exposición a IDPN, datos mostrados en función de la dosis (400 a 1000 mg / kg, ver leyenda), zona (central / estriola vs periferia) y epitelio vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes del margen superior a la izquierda muestran el marcaje con Myo7a (rojo) y calretinina (blanco) para identificar la población de HClI. Barras de escala: 10 μ m. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HClI ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y la dosis de IDPN. Los números debajo de las barras indican el número de animales. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

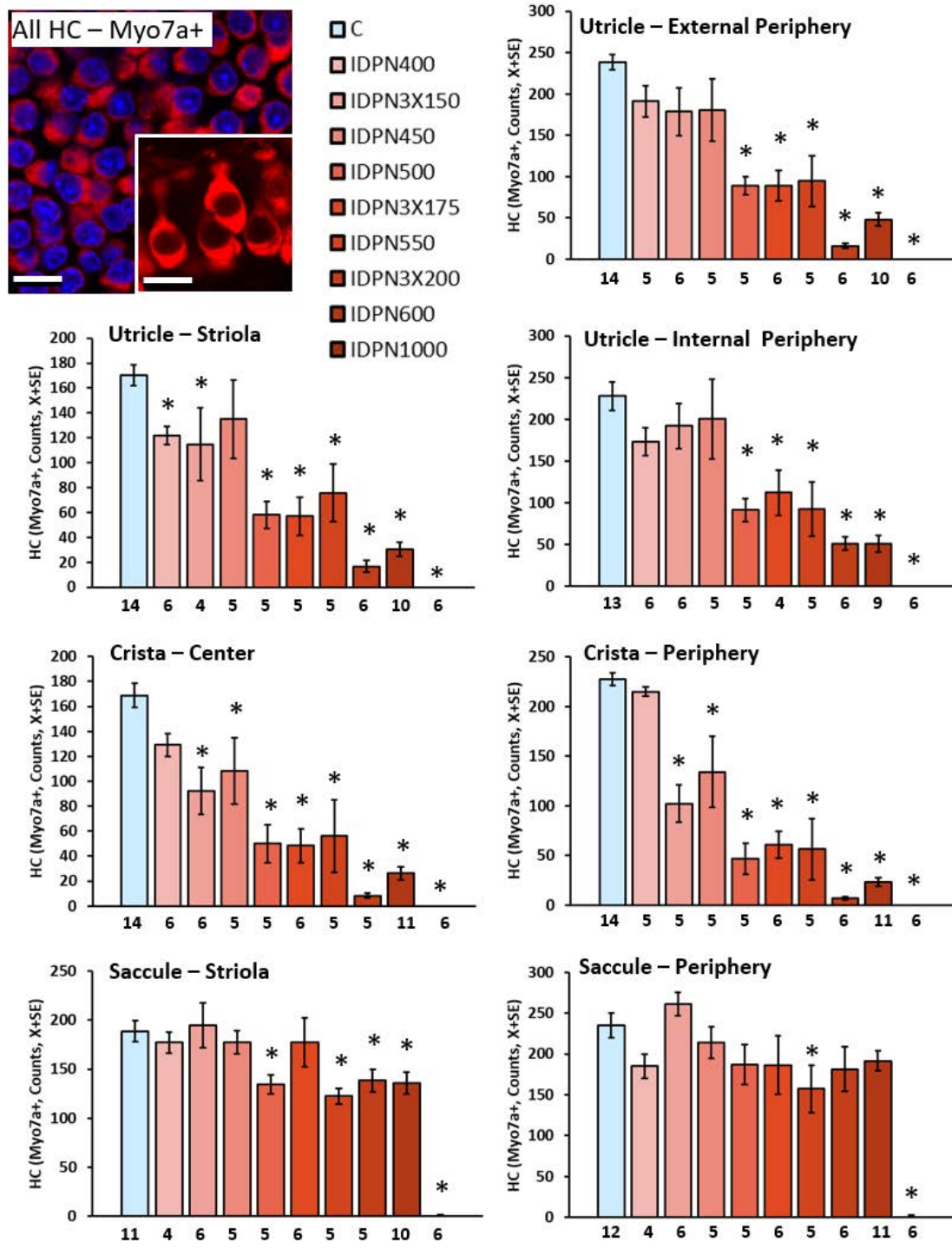
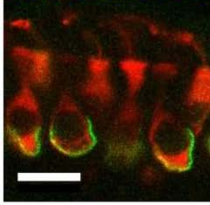
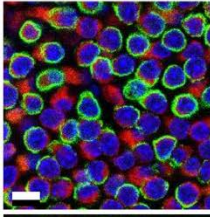


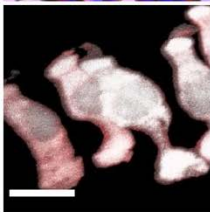
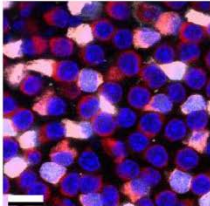
Figura R7. Diferencias en la pérdida del número total de células ciliadas (HCs) después de la exposición a IDPN, datos mostrados en función de la dosis (400 a 1000 mg / kg, ver leyenda), zona (central / estriola vs periferia) y epitelio vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes del margen superior a la izquierda muestran el marcaje con Myo7a (rojo) para identificar la población de HCs. Barras de escala: 10 μ m. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCs ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y la dosis de IDPN. Los números debajo de las barras indican el número de animales. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

La Figura R8 presenta los diferentes recuentos celulares unificados en una sola figura con el objetivo de facilitar el análisis conjunto de los resultados.

HCI – Myo7/Caspr1+



HCII – Myo7/Calre+



All HC – Myo7a+

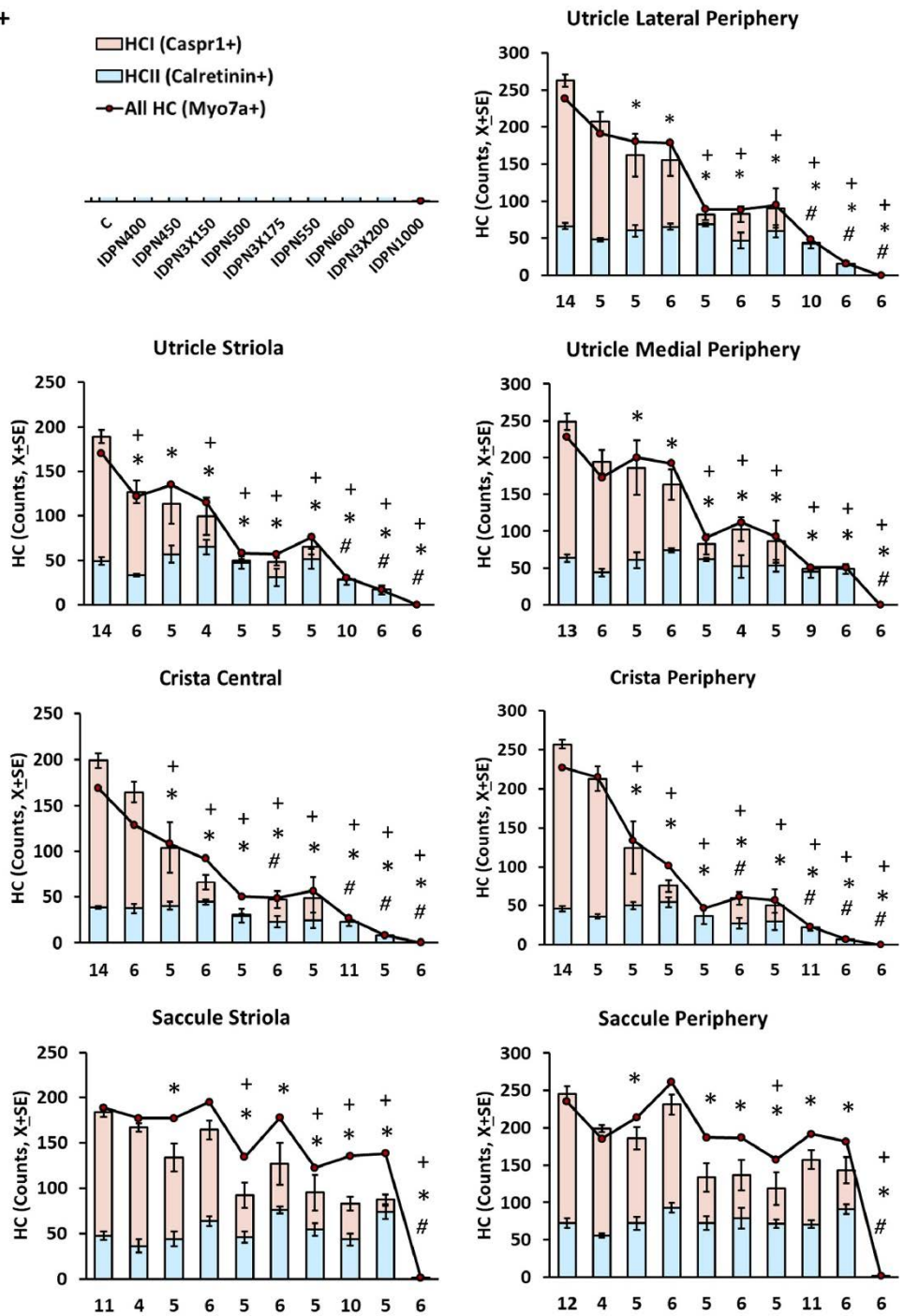
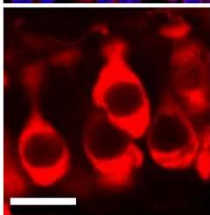
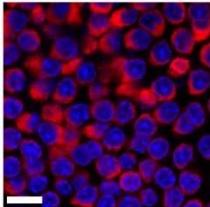


Figura R8. Diferencias en la pérdida de células ciliadas de tipo I (HCI), tipo II (HCII) y en el conjunto de células ciliadas (HCs) después de la exposición a IDPN en función de la dosis (400 a 1000mg/kg), zona (central/estriolar y periférica) y tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes de la izquierda muestran los marcajes utilizados para diferenciar las poblaciones celulares. Caspr1 (verde) y Myo7a (rojo) para las células ciliadas de tipo I (HCI), calretinina (blanco) y Myo7a (rojo) para las de tipo II (HCII) y Myo7a (rojo) para el número total de células ciliadas (HCs). Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCI y HCII superpuestos (X ± SE) según el tejido vestibular analizado, su región y la dosis de IDPN. La línea representa el promedio del recuento de células ciliadas (HCs). Las barras de error para el total de HC no se incluyen para una mayor claridad. Los números debajo de las barras indican el número de animales. #, *, +: p < 0.05, diferencias significativas respecto al grupo control para HCII, HCI y HCs, respectivamente, con la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. La pérdida de HCI comienza con dosis bajas de IDPN, mientras que estas no tienen ningún efecto sobre los recuentos de HCII, particularmente en el sáculo.

1.5 Recuento celular adicional en el segundo hemisferio con Tenascina, calretinina, Myo7a y Oncomodulina

Con el objetivo de reforzar los resultados anteriores, se utilizó la segunda oreja de los animales del segundo y tercer experimento para realizar un recuento adicional e independiente con los marcajes Tenascina-C, calretinina y Myo7a para identificar las células de tipo I, II y el total de células ciliadas respectivamente. Adicionalmente a los anteriores, se añadió Oncomodulina, presente en las células de tipo I (en una baja proporción también en las células ciliadas de tipo II) de la zona central/estriolar, para delimitar con mayor seguridad las zonas centrales/estriolares de las periféricas (Figura R9).

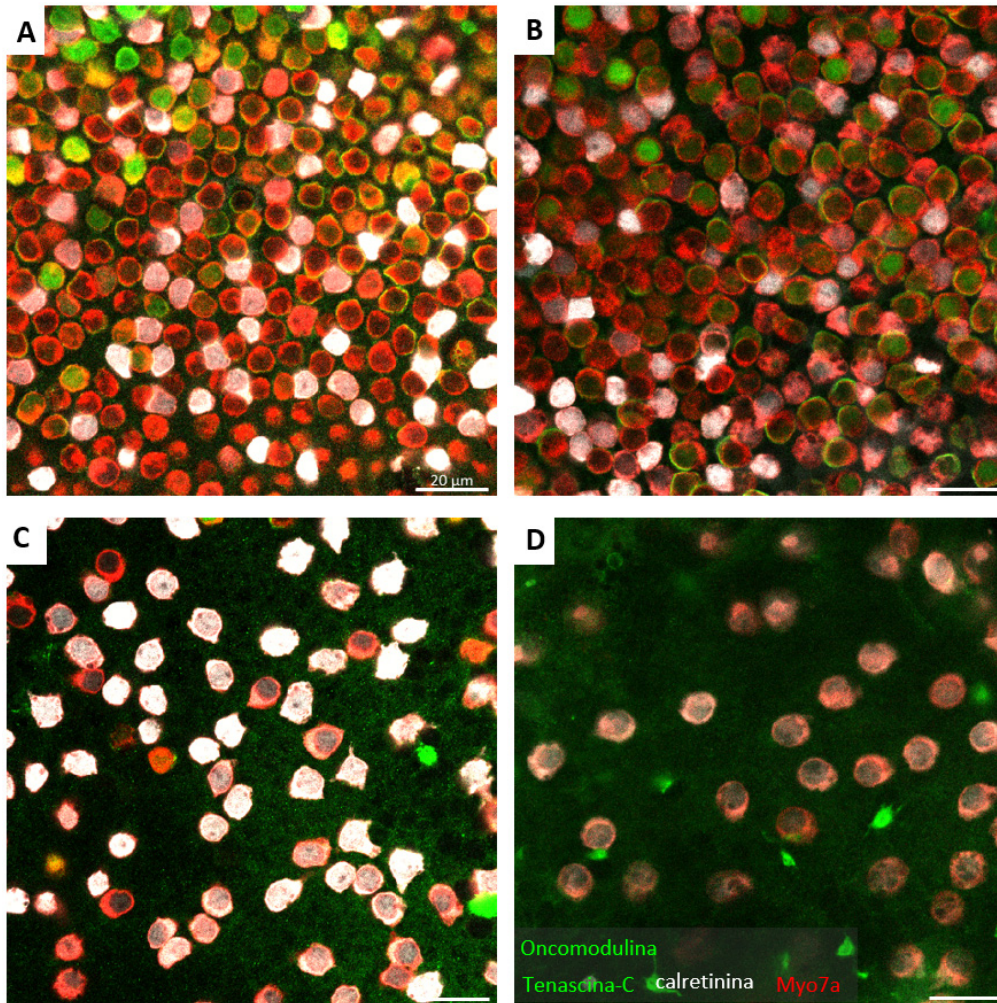


Figura R9. Efecto en la densidad de células ciliadas tras la exposición con IDPN. Las imágenes mostradas a modo de ejemplo corresponden a la zona medial del utrículo, en la periferia respecto a la estriola. Las células ciliadas de tipo I (HCI) se caracterizan por la presencia de Tenascina-C en la cara interna de la terminal calicinar (marcada en verde). Las células ciliadas de tipo (II) se pueden distinguir por la presencia de calretinina (marcada en blanco) en el citoplasma además de Myo7a (marcada en rojo). La zona estriolar o central fue identificada mediante la proteína Oncomodulina (marcada en verde), presente únicamente en las células ciliadas estriolares de tipo I y en menor medida de tipo II. Las imágenes mostradas son proyecciones de un stack de capturas mediante microscopía confocal y optimizadas para representar la densidad celular. Para el recuento de células, ya que se utilizó un stack igual al grosor del tejido, las distintas poblaciones celulares fueron propiamente diferenciadas. A: Densidad normal de células en ratas control. B: Pérdida leve de HCI en la mayoría de las ratas que recibieron tres dosis de IDPN a 150mg/kg. C: Gran pérdida de HCI en ratas a las que se le administraron tres dosis de IDPN a 175mg/kg. D: Pérdida completa de HCI en las ratas que recibieron tres dosis de IDPN a 200mg/kg. Barras de escala: 20 μ m.

En estos recuentos se obtuvieron unos resultados muy similares a los mostrados anteriormente, confirmando la respuesta de los diferentes epitelios sensoriales, zonas y tipos celulares al IDPN (Figuras R10, R11 y R12)

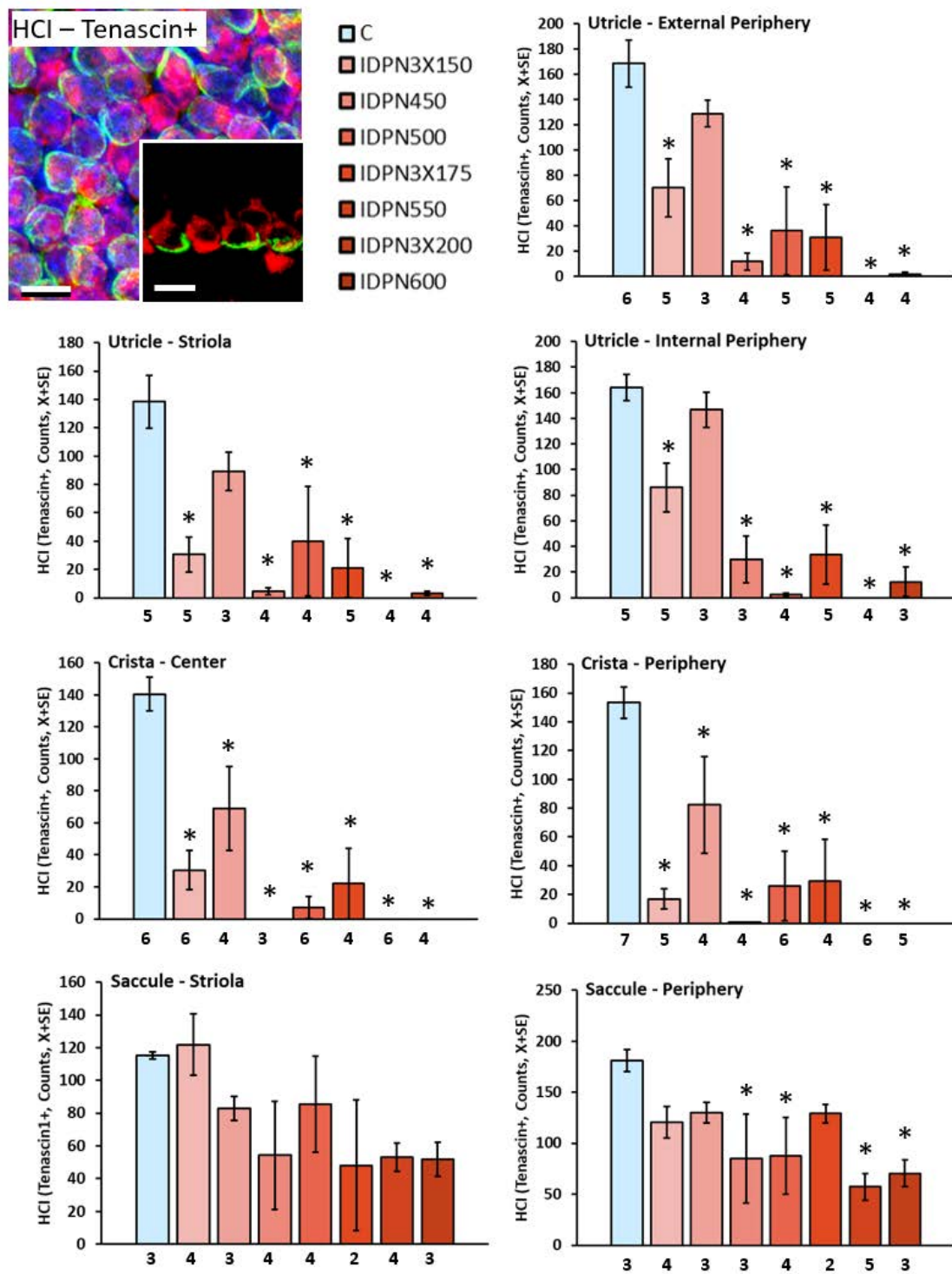


Figura R10. Recuento adicional donde se muestran las diferencias en la pérdida de células ciliadas tipo I (HCl) después de la exposición a IDPN, datos mostrados en función de la dosis (450 a 600 mg / kg, ver leyenda), zona (central / estriola vs periferia) y epitelio vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes del margen superior a la izquierda muestran el marcaje con Myo7a (rojo) y Tenascina-C (verde) para identificar la población de HCl. Barras de escala: 10 μ m. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCl ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y la dosis de IDPN. Los números debajo de las barras indican el número de animales. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

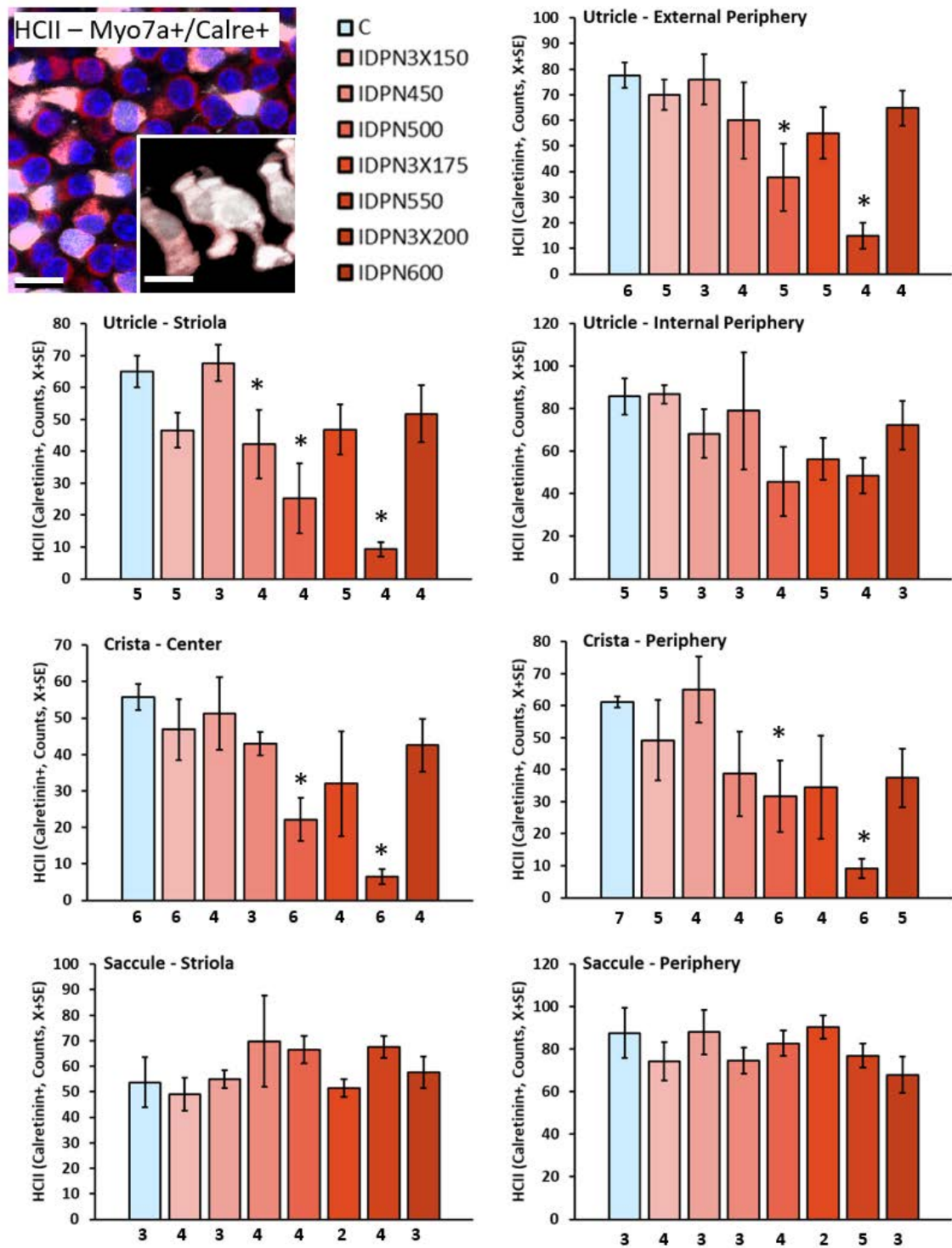


Figura R11. Recuento adicional donde se muestran las diferencias en la pérdida de células ciliadas tipo II (HCII) después de la exposición a IDPN, datos mostrados en función de la dosis (450 a 600 mg / kg, ver leyenda), zona (central / estriola vs periferia) y epitelio vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes del margen superior a la izquierda muestran el marcaje con Myo7a (rojo) y calretinina (blanco) para identificar la población de HCII. Barras de escala: 10 μ m. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCII ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y la dosis de IDPN. Los números debajo de las barras indican el número de animales. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

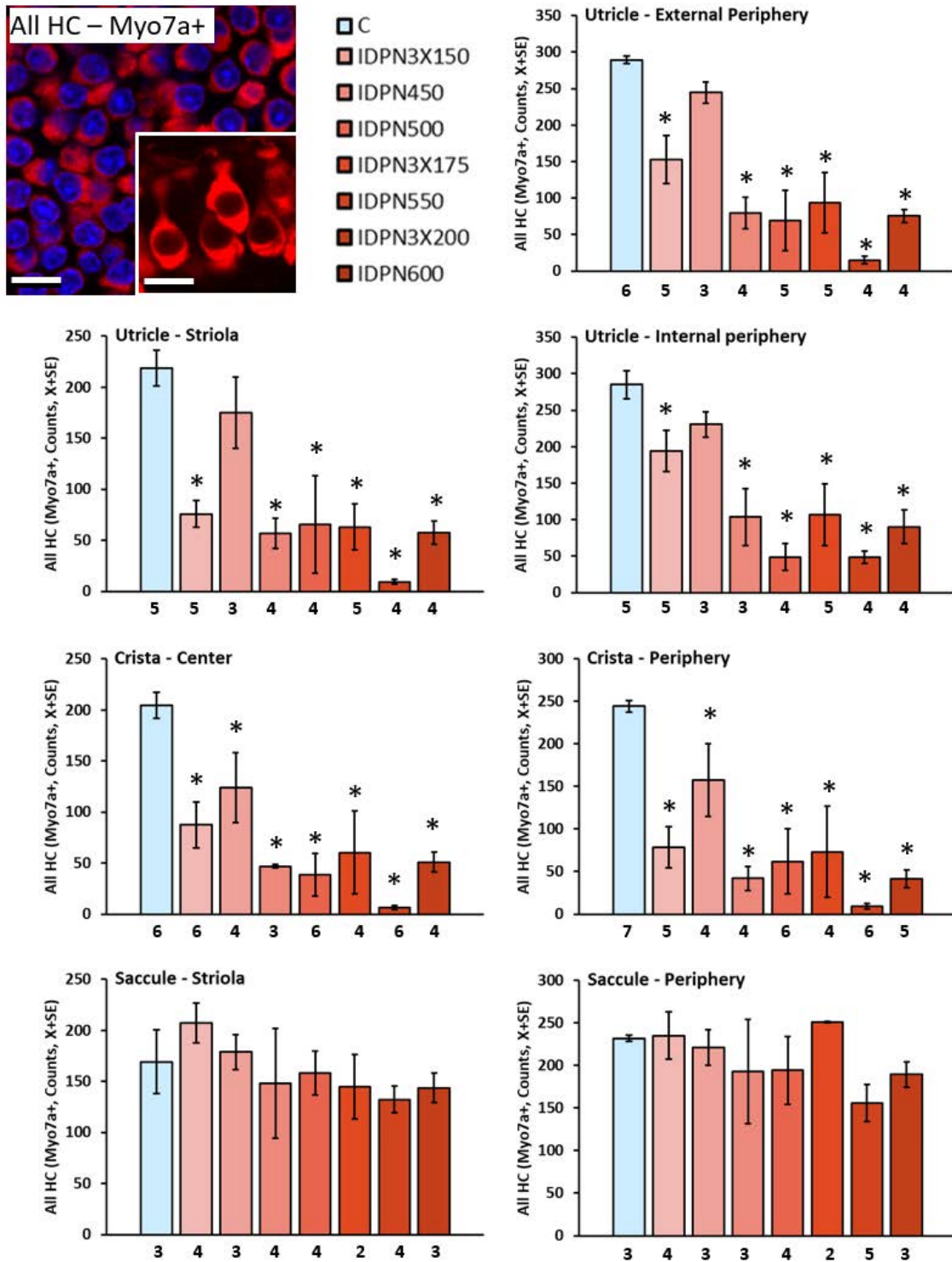


Figura R12. Recuento adicional donde se muestran las diferencias en la pérdida del número total de células ciliadas (HCs) después de la exposición a IDPN, datos mostrados en función de la dosis (450 a 600 mg / kg, ver leyenda), zona (central /estriola vs periferia) y epitelio vestibular (utrículo, cresta y sáculo). Las imágenes del margen superior a la izquierda muestran el marcaje con Myo7a (rojo) para identificar la población de HCs. Barras de escala: 10 μ m. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCs ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y la dosis de IDPN. Los números debajo de las barras indican el número de animales. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

Como tendencia general se observaron las siguientes diferencias de sensibilidad al tratamiento a partir del conjunto de resultados obtenidos: HCI >> HCII, cresta = utrículo>sáculo, y centro/estriola ligeramente más sensible a la periferia.

1.6 Relación entre la pérdida de células ciliadas y los reflejos anti gravitacionales

Con el objetivo de relacionar las poblaciones de células ciliadas de ambos tipos con los reflejos anti gravitacionales tail-lift y air-right, se representaron gráficamente los recuentos celulares con las medidas cuantitativas de cada uno de los reflejos.

Los ángulos del tail-lift y tiempos de air-right disminuían y aumentaban respectivamente a causa de la pérdida celular, signo de una pérdida funcional progresiva. Además, se observaron diferencias relacionales entre los distintos tipos celulares y tejidos con ambos reflejos.

En tail-lift hubo una asociación estadísticamente significativa entre el ángulo y el número de células ciliadas de tipo I en todos los tejidos y zonas (Figura R13), mientras que para las de tipo II fue significativa únicamente en cresta (Figura R14). Como se puede apreciar en las gráficas, muchos animales perdieron este reflejo por completo aun conservando gran parte de las células ciliadas de tipo II. Teniendo en cuenta el número total de células ciliadas, la asociación es significativa para el conjunto de tejidos y zonas estudiadas a excepción de la periferia del sáculo (Figura R15).

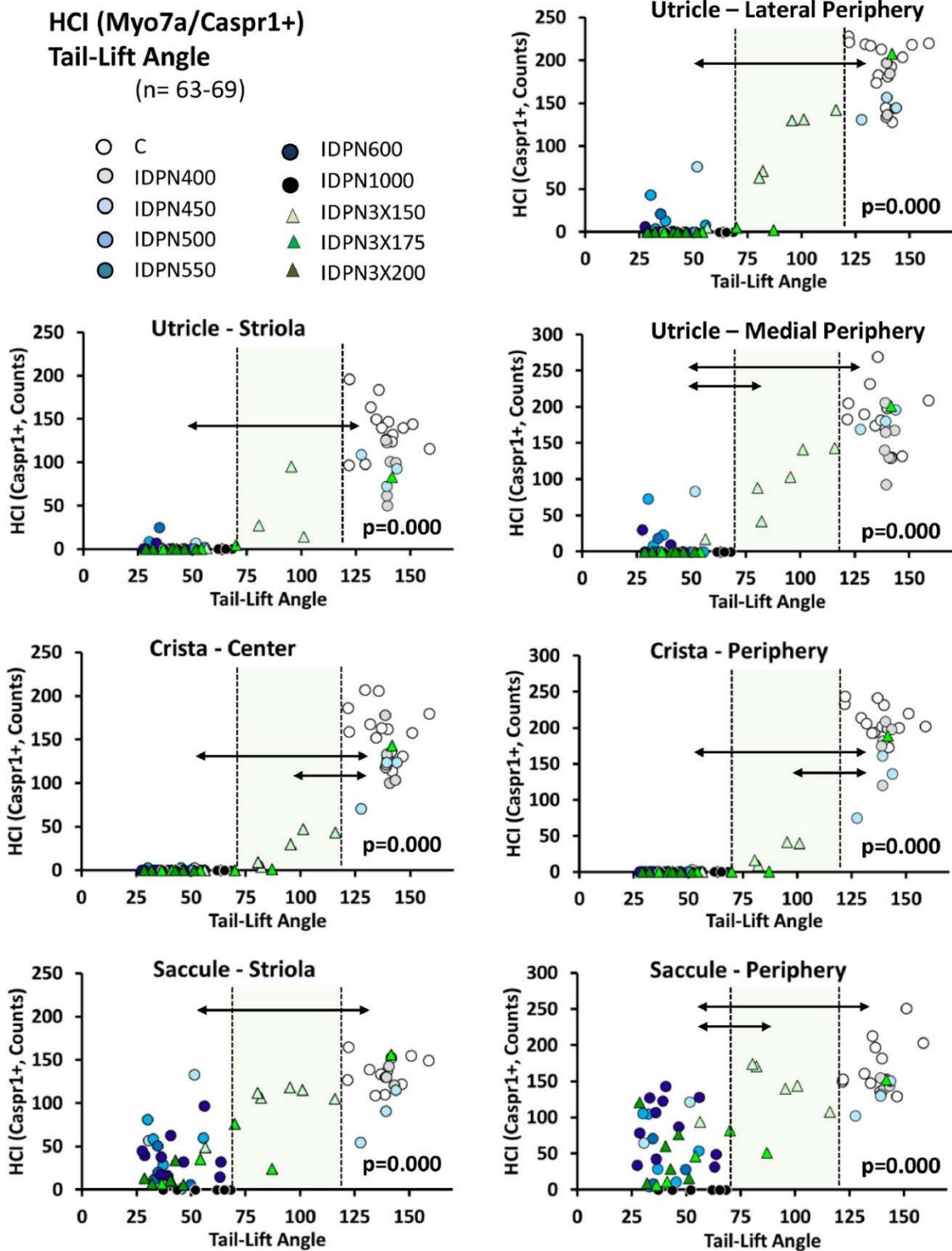


Figura R13. Relación entre la pérdida de células ciliadas de tipo I (HCI) y la disminución del ángulo mínimo en el reflejo tail-lift tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de ángulos de una respuesta normal (120 grados definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (70 grados marcado por el grupo de ratas IDPN1000). Estos valores límite clasificaron a las ratas en tres grupos: con ángulos altos, medios y bajos. El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCI de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de ángulo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

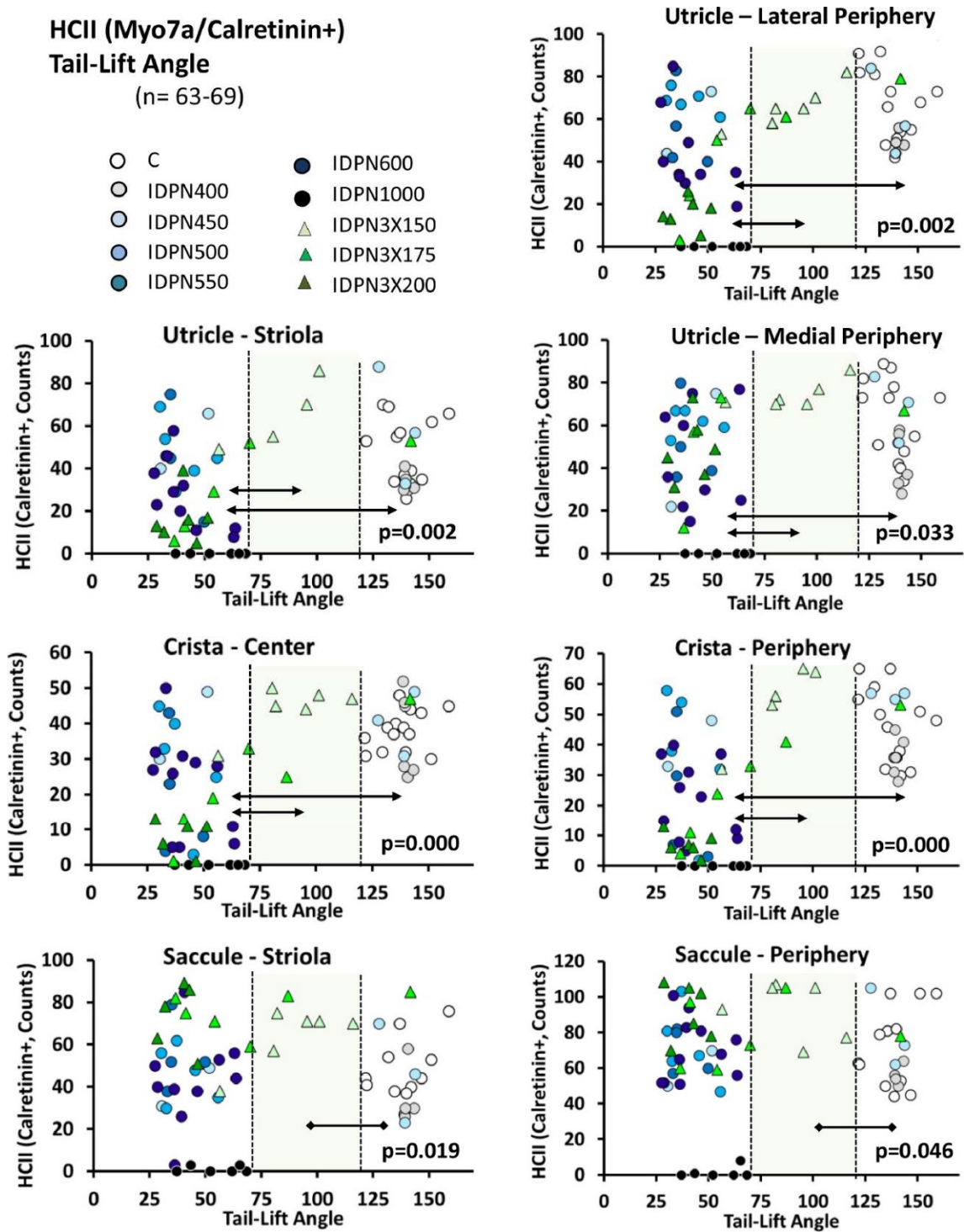


Figura R14. Relación entre la pérdida del número de células ciliadas de tipo II (HCI) y la disminución de ángulo mínimo en el reflejo tail-lift tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de ángulos de una respuesta normal (120 grados definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (70 grados marcado por el grupo de ratas IDPN1000). Estos valores límite clasificaron a las ratas en tres grupos: con ángulos altos, medios y bajos. El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCI de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de ángulo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

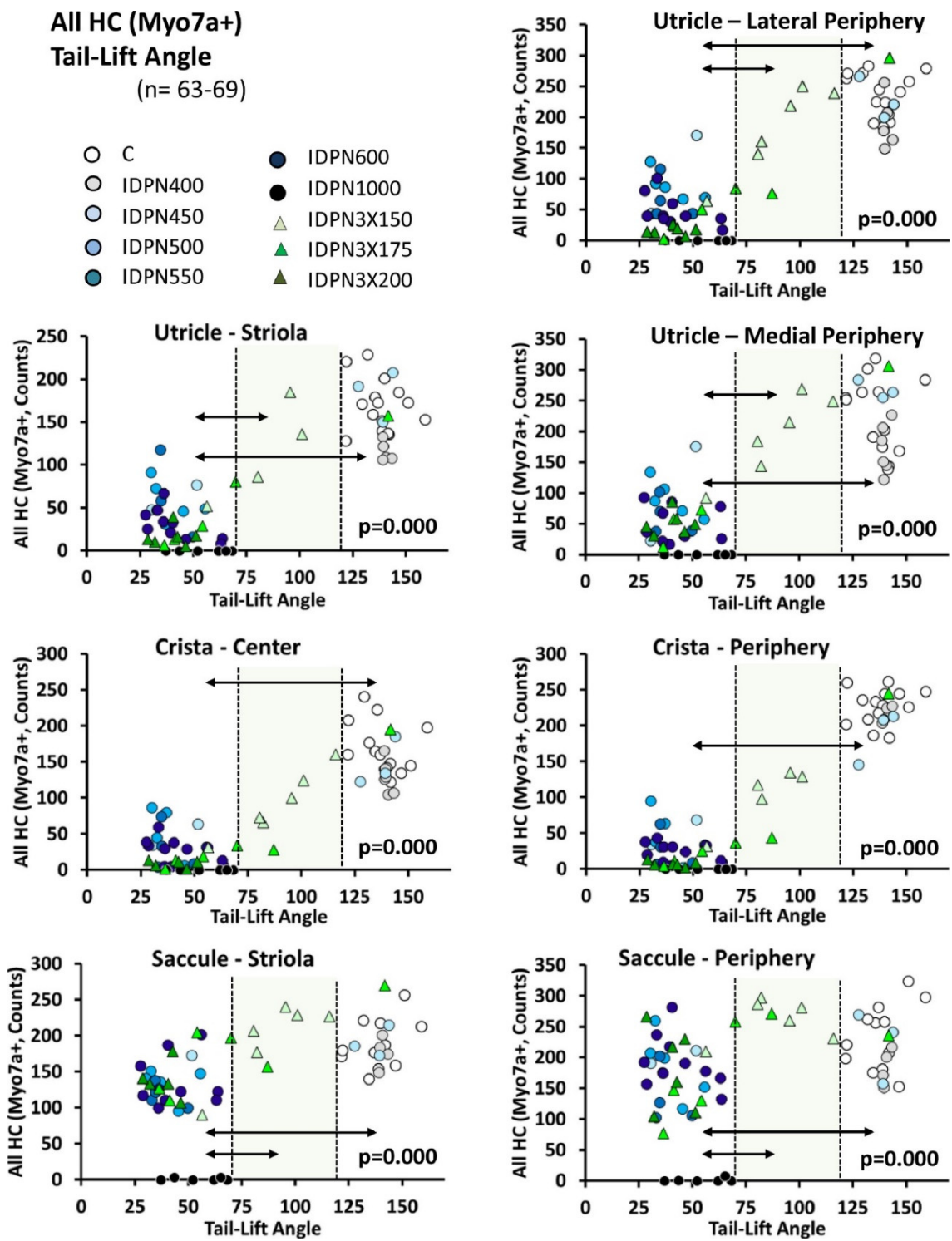


Figura R15. Relación entre la pérdida del total de células ciliadas (HCs) y la disminución del ángulo mínimo en el reflejo tail-lift tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de ángulos de una respuesta normal (120 grados definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (70 grados marcado por el grupo de ratas IDPN1000). Estos valores límite clasificaron a las ratas en tres grupos: con ángulos altos, medios y bajos. El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCs de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de ángulo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

Por otro lado, en el reflejo air-right las gráficas también muestran una asociación significativa con la población de células ciliadas de tipo I. Sin embargo, al aumentar los tiempos de air-right por encima del umbral de normalidad establecido (170ms), prácticamente no existen células de tipo I en cresta y utrículo. Incluso dentro del grupo de animales con un comportamiento normal para este reflejo, una parte de ellos registraron pérdidas significativas en el número HCI (Figura R16). Para la población de células de tipo II se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en el centro y periferia de la cresta, en la estriola y periferia lateral, pero no medial del utrículo y ambas zonas del sáculo (Figura R17). Finalmente, para el total de células ciliadas (Myo7a+) se hallaron asociaciones significativas en todos los epitelios y zonas estudiadas (Figura R18).

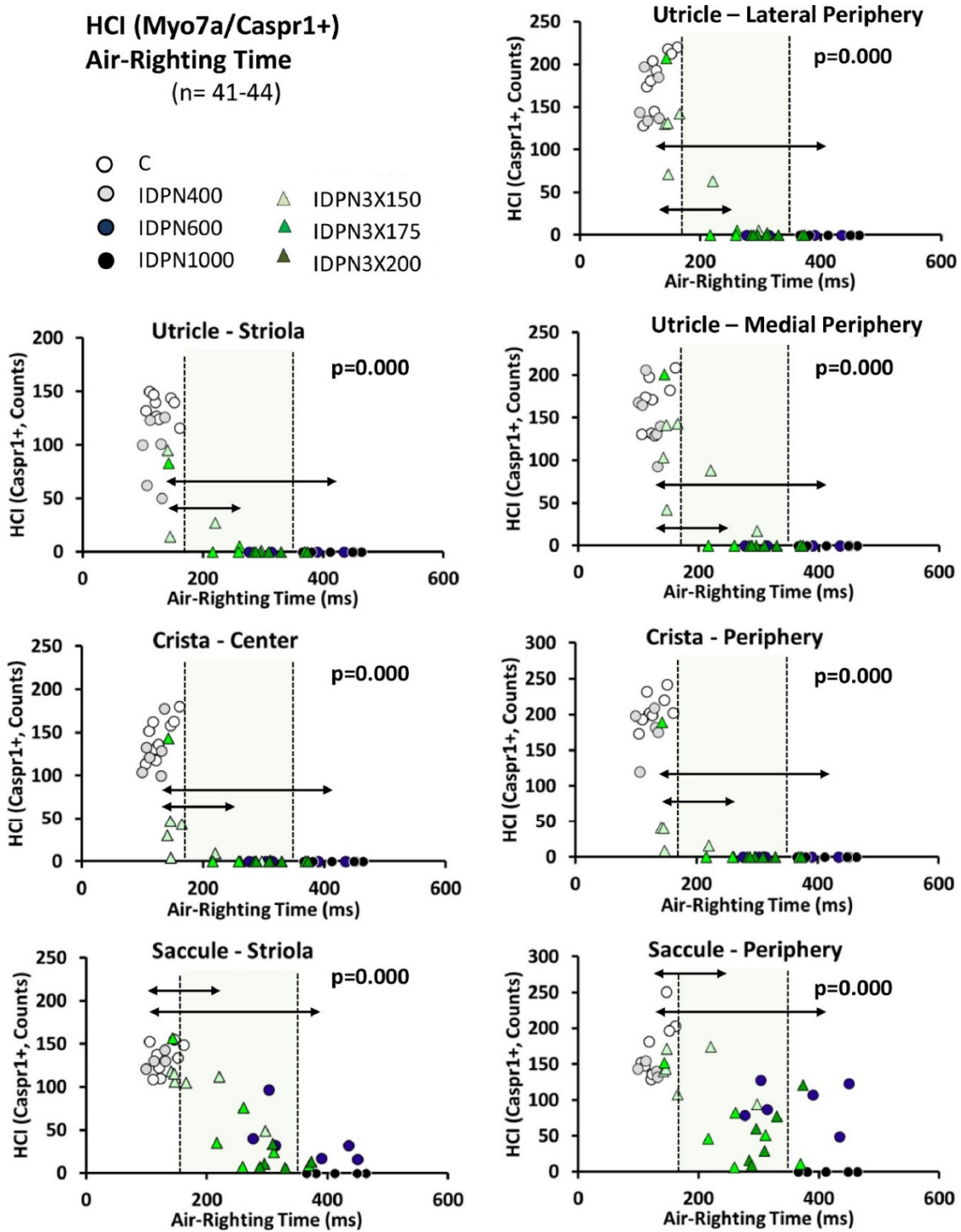


Figura R16. Relación entre la pérdida de células ciliadas de tipo I (HCI) y el tiempo que necesita la rata para enderezar su cabeza desde una posición supina en el reflejo air-right tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de tiempo de una respuesta normal (170 ms definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (350ms marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCI de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de tiempo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

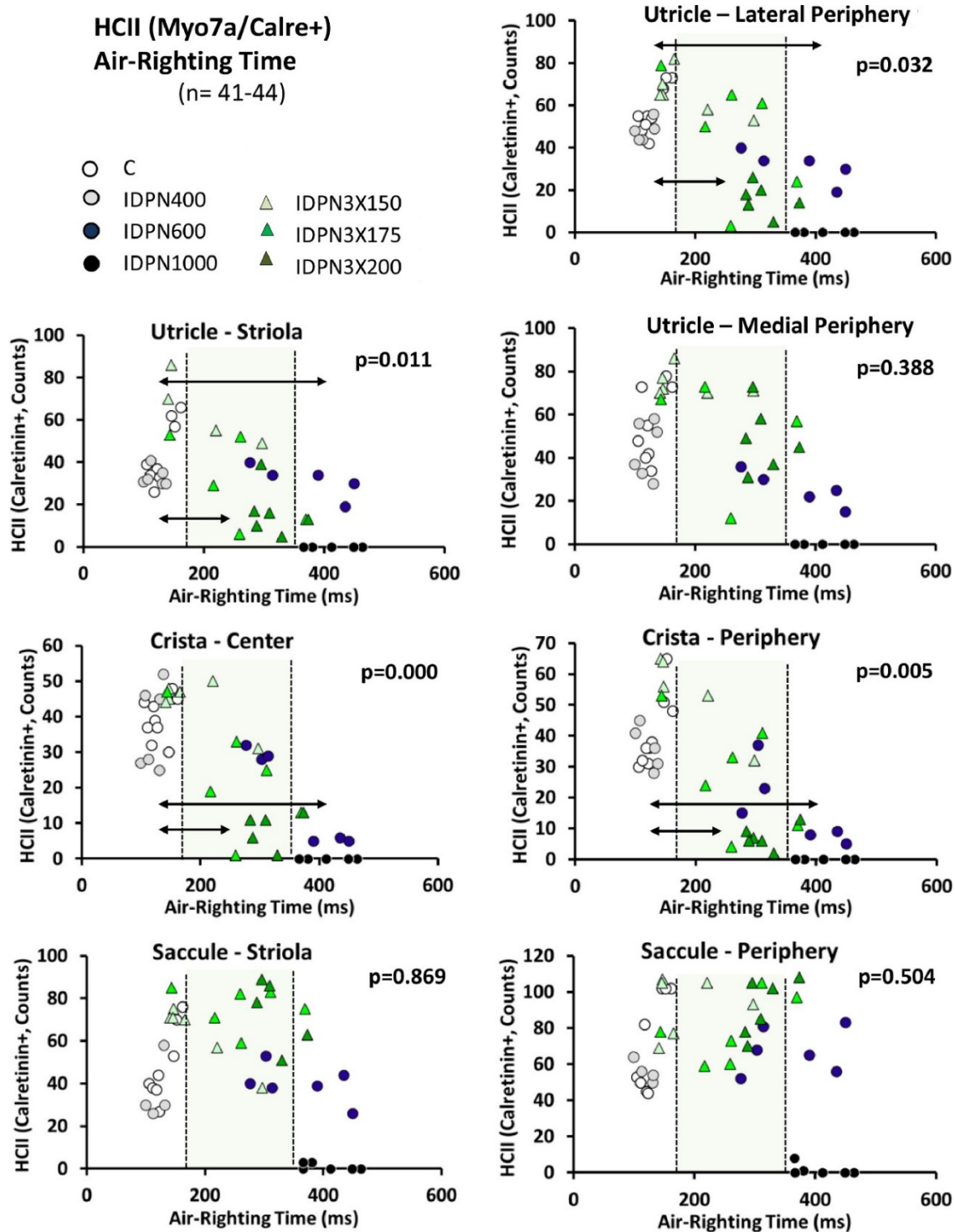


Figura R17. Relación entre la pérdida de células ciliadas de tipo II (HCII) y el tiempo que necesita la rata para enderezar su cabeza desde una posición supina en el reflejo air-right tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de tiempo de una respuesta normal (170 ms definido por el grupo de control) y en ausencia de función vestibular (350ms marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCII de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de tiempo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

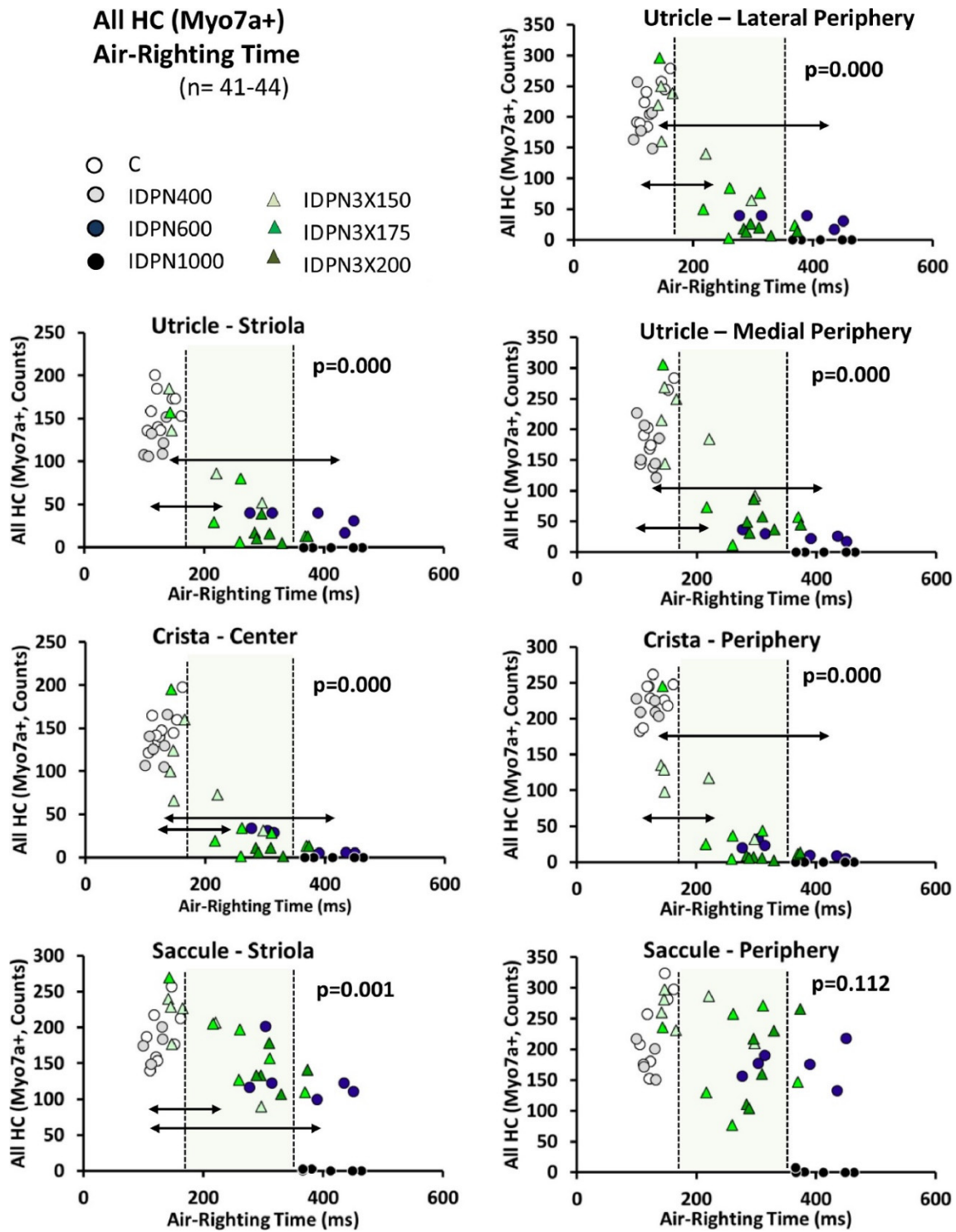


Figura R18. Relación entre la pérdida del número total de células ciliadas (HCs) y el tiempo que necesita la rata para enderezar su cabeza desde una posición supina en el reflejo air-right tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de tiempo de una respuesta normal (170 ms definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (350ms marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCs de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de tiempo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

Se tuvieron en cuenta, adicionalmente, los segundos recuentos con Tenascina y Oncomodulina con una mayor precisión en la localización de las zonas centrales y estriolares. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los anteriores tanto en tail-lift (Figuras R19, R20, R21) como air-right (R22, R23 y R24).

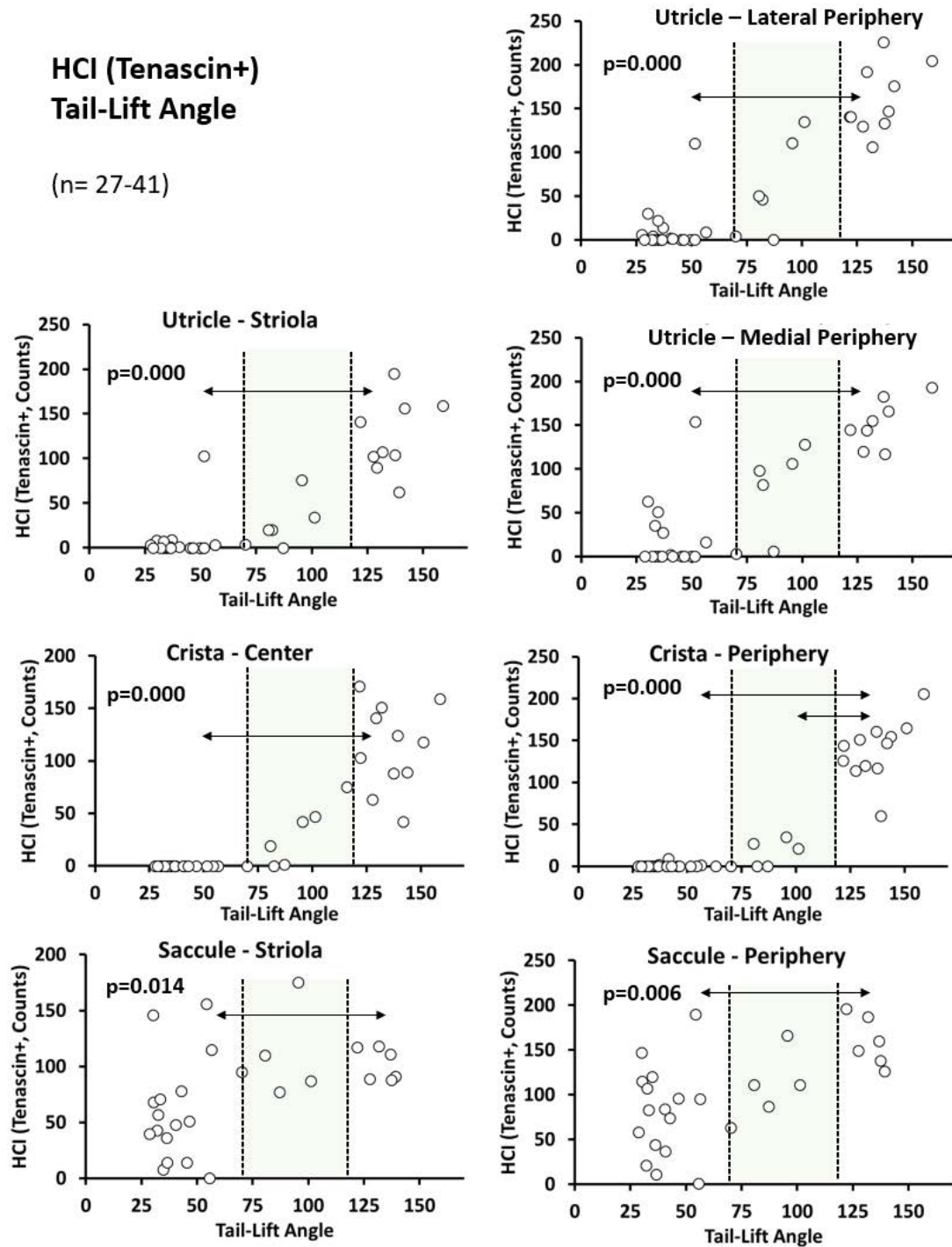


Figura R19. Relación entre la pérdida de células ciliadas de tipo I (HCI) y la disminución del ángulo mínimo en el reflejo tail-lift tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de ángulos de una respuesta normal (120 grados definido por el grupo de control) y en ausencia de función vestibular (70 grados marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCI de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de ángulo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

HCI (Myo7a+/Calre+) Tail-Lift Angle

(n= 27-41)

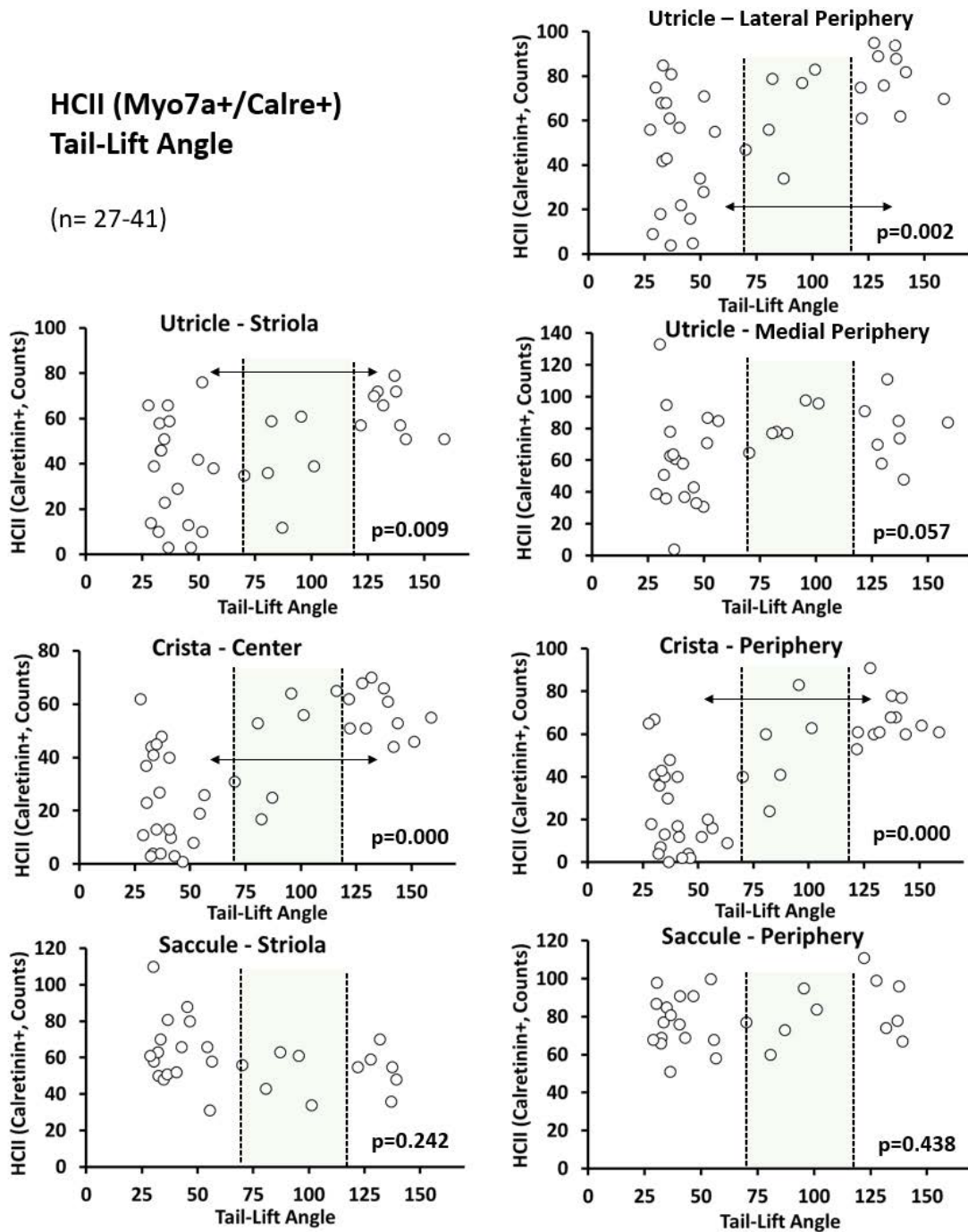


Figura R20. Relación entre la pérdida del número de células ciliadas de tipo II (HCI) y la disminución del ángulo mínimo en el reflejo tail-lift tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de ángulos de una respuesta normal (120 grados definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (70 grados marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCI de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de ángulo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

All HC (Myo7a+) Tail-Lift Angle

(n= 27-41)

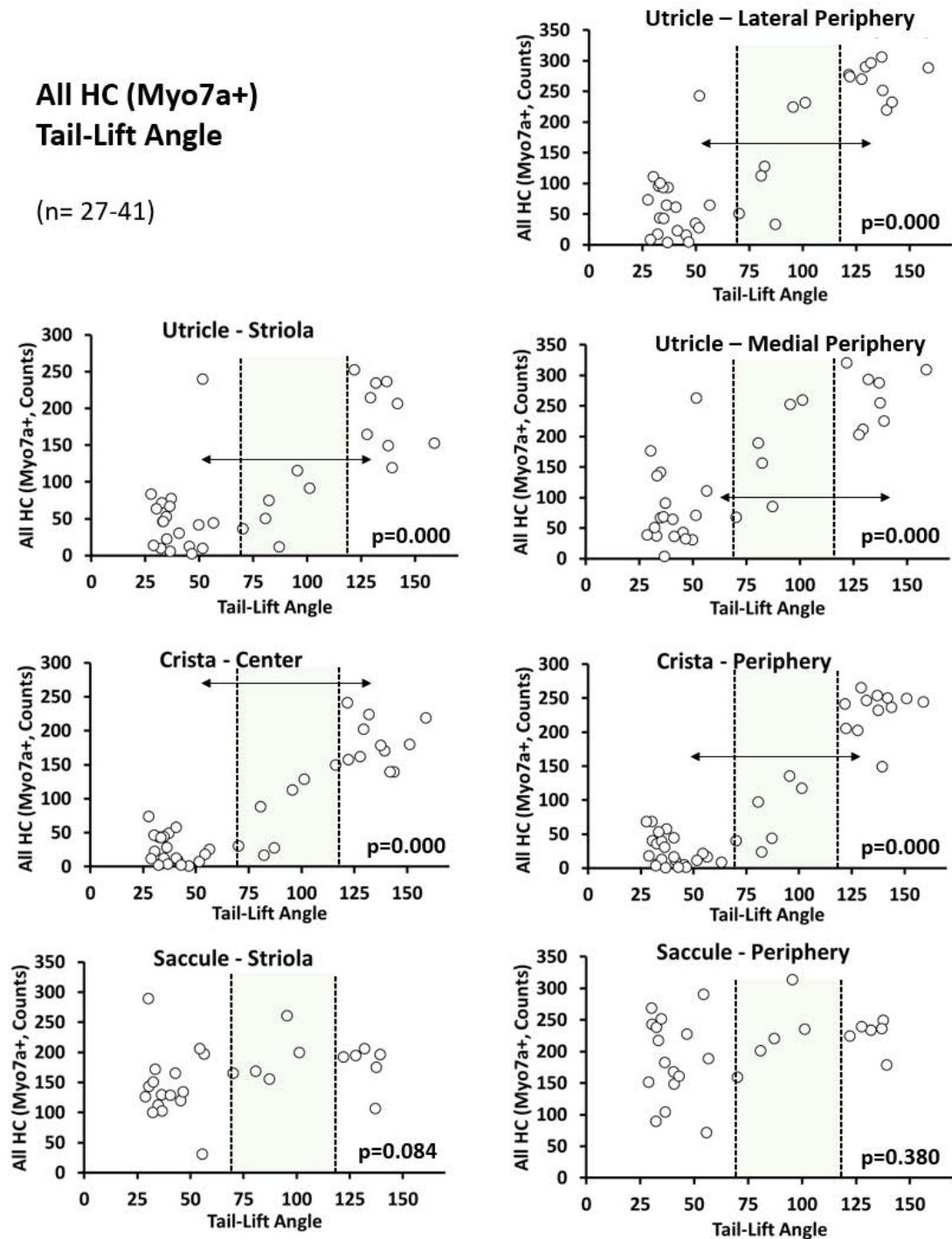


Figura R21. Relación entre la pérdida del número total de células ciliadas (HCs) y la disminución del ángulo mínimo en el reflejo tail-lift tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de ángulos de una respuesta normal (120 grados definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (70 grados marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCs de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de ángulo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

HCl (Tenascin+) Air-Righting Time

(n= 13-20)

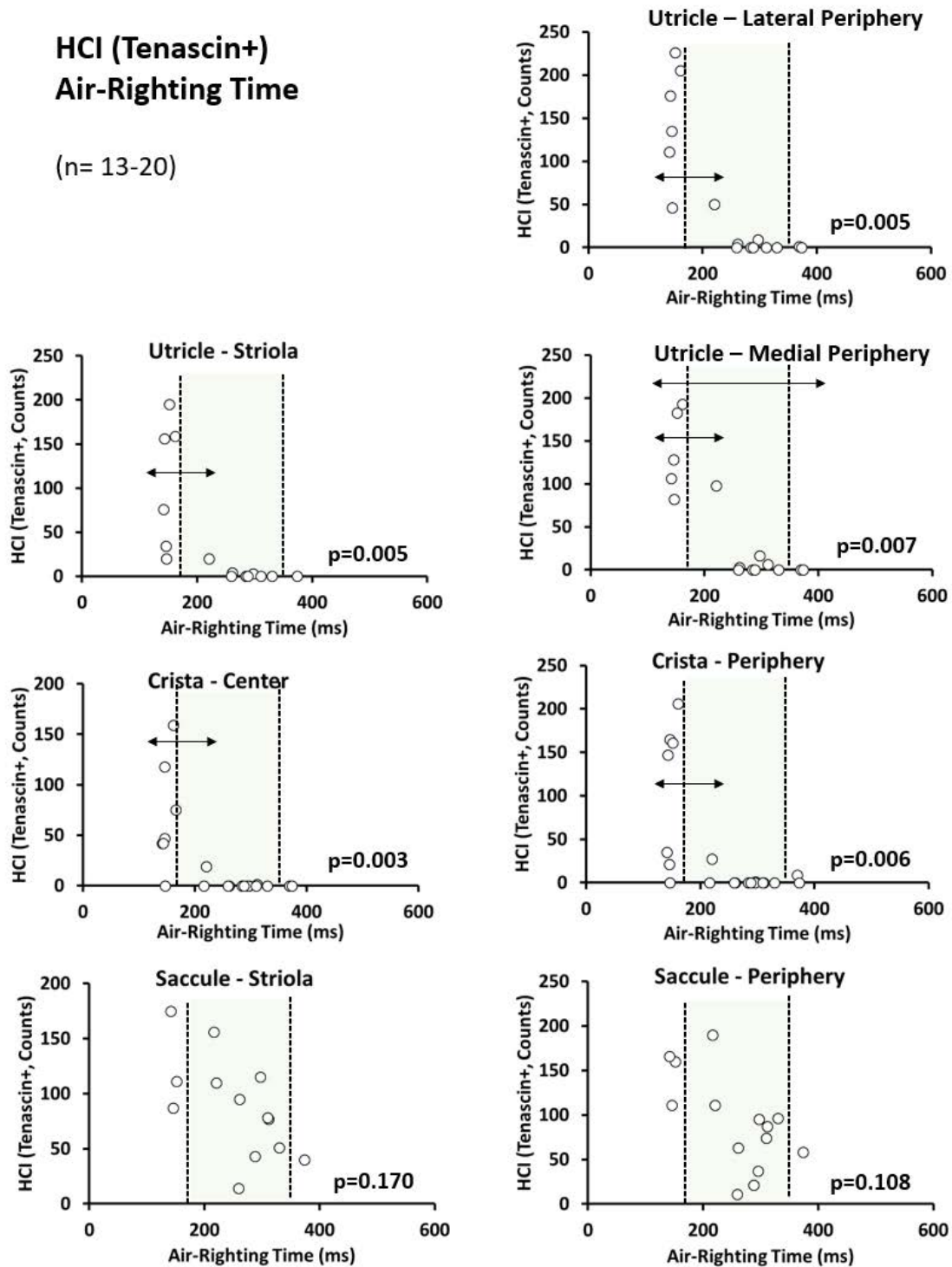


Figura R22. Relación entre la pérdida de células ciliadas de tipo I (HCl) y el tiempo que necesita la rata para enderezar su cabeza desde una posición supina en el reflejo air-right tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de tiempo de una respuesta normal (170 ms definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (350ms marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCl de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de tiempo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

HCI (Myo7a+/Calre+) Air-Righting Time

(n= 13-20)

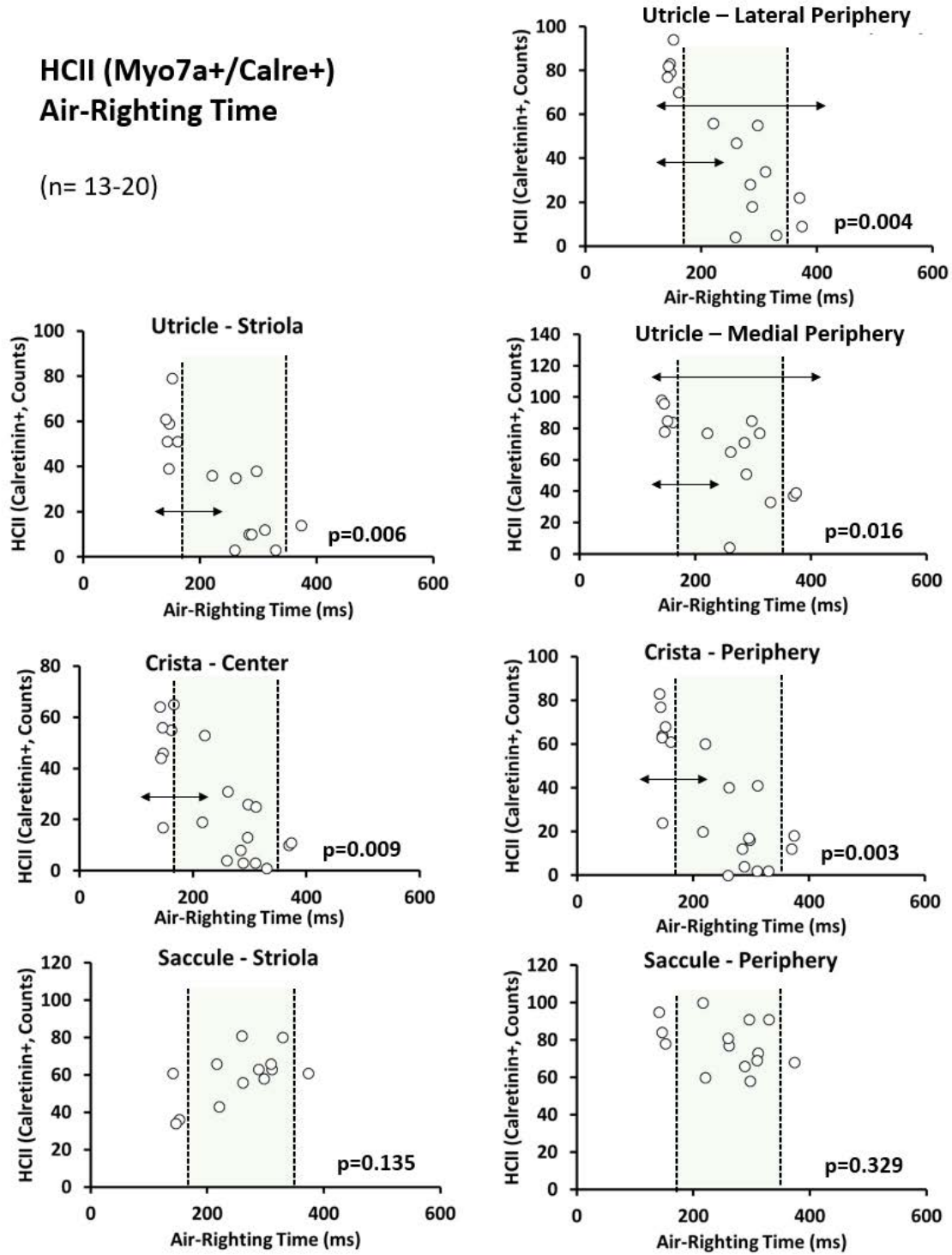


Figura R23. Relación entre la pérdida de células ciliadas de tipo II (HCI) y el tiempo que necesita la rata para enderezar su cabeza desde una posición supina en el reflejo air-right tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de tiempo de una respuesta normal (170 ms definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (350ms marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCI de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de tiempo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

All HC (Myo7a+) Air-Righting Time

(n= 13-20)

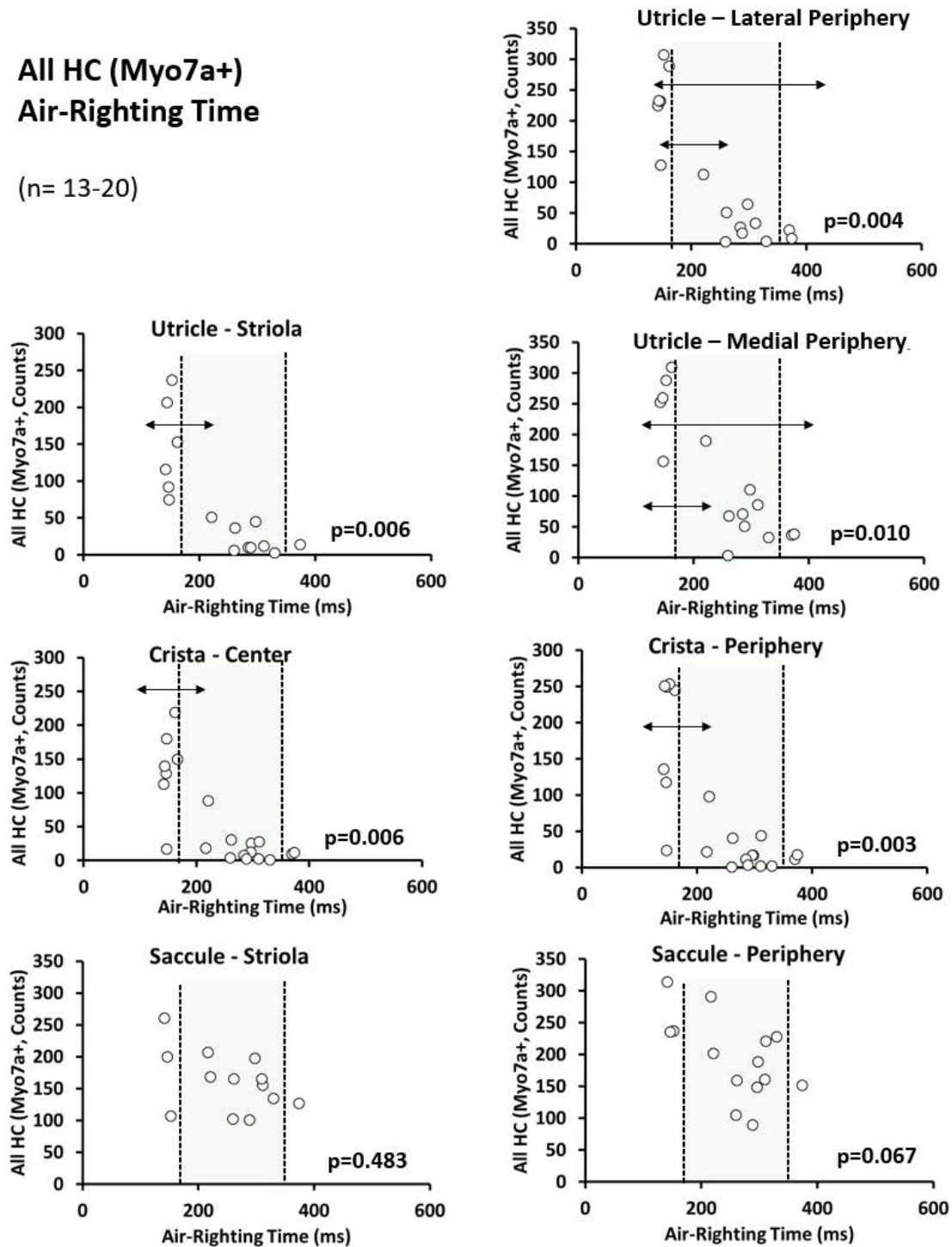


Figura R24. Relación entre la pérdida del número total de células ciliadas y el tiempo que necesita la rata para enderezar su cabeza desde una posición supina en el reflejo air-right tras la exposición a diferentes dosis de IDPN. Las gráficas muestran la relación en función del tejido vestibular (utrículo, cresta y sáculo) y su zona (central/estriolar y periférica). En cada gráfica, las líneas de puntos verticales indican el umbral de tiempo de una respuesta normal (170 ms definido por el grupo control) y en ausencia de función vestibular (350ms marcado por el grupo de ratas IDPN1000). El valor p indica el grado de significación estadística entre la mediana de los recuentos de HCs de ratas en los tres grupos definidos por los umbrales de tiempo. Las flechas indican significación ($p < 0.05$) de las comparaciones post-hoc dos a dos.

1.7 Análisis de las sinapsis en las células ciliadas de tipo II

Las diferencias observadas entre la respuesta de las células ciliadas de tipo I y II en ambos reflejos son evidentes, además de su sensibilidad diferencial al IDPN.

Estudios recientes han demostrado que el desacoplamiento sináptico es una de las principales causas de pérdida funcional antes de que la pérdida celular se manifieste (Sedó-Cabezón et al., 2015; Sultemeier y Hoffman, 2017; Cassel et al., 2019; Greguske et al., 2019). Por lo tanto, este hecho podría estar distorsionando los resultados obtenidos al incluir en el recuento células no funcionales. Para descartar esta hipótesis, se estudió el estado de las sinapsis de las HCII restantes en cresta mediante un recuento de densidades pre y post sinápticas (con Ribeye y PSD95 como referencia respectivamente).

La Figura R25 muestra que las HCII presentes no se han desacoplado en su sinapsis, ya que los recuentos sinápticos de HCII en animales control fueron muy similares a los de los animales con una gran pérdida vestibular.

Los valores de la prueba de T Student fueron 0.138 para Ribeye y 0.403 para PSD95, ambos mayores a 0.05 (20 grados de libertad). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre el número medio de puntos sinápticos de Ribeye o PSD95 por célula en ratas con ángulos de tail-lift o tiempos de air-right por encima o por debajo del umbral.

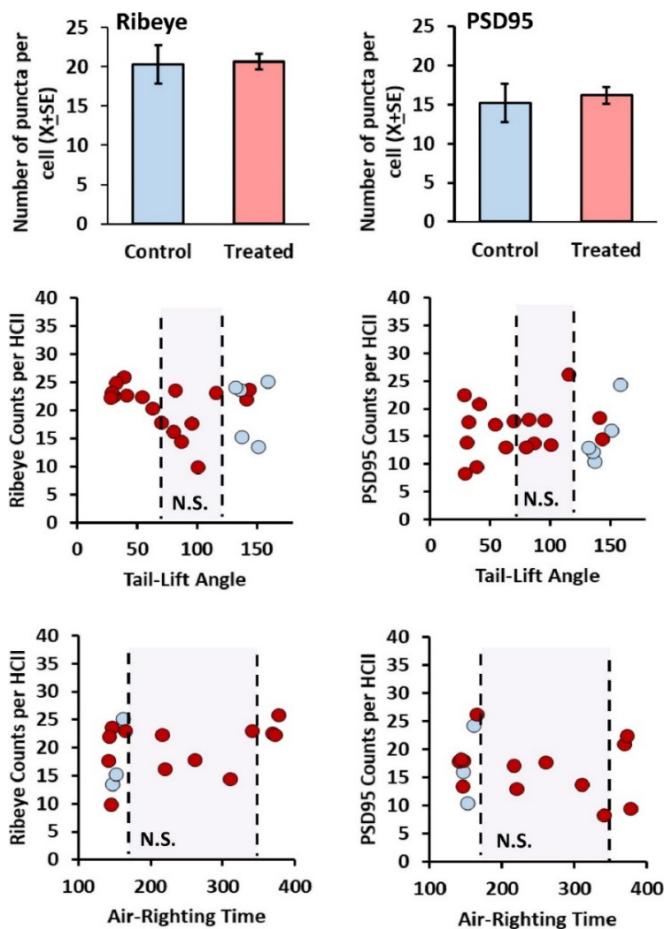


Figura R25. Recuento de puntos presinápticos (Ribeye) y postsinápticos (PSD95) en HCII de ratas control ($n = 5$) y con lesiones vestibulares graduales ($n = 17$), seleccionadas para cubrir el espectro de valores de ángulos y tiempos de los reflejos tail-lift y air-right respectivamente. Los gráficos de barras muestran los valores de $X + SE$ para las ratas control y tratadas, independientemente de la dosis de IDPN. Las cuatro últimas gráficas presentan la relación entre los datos de comportamiento y los puntos sinápticos (puntos azules: ratas de control; puntos rojos: ratas tratadas).

CAPÍTULO II: EFECTO DE LA TOXICIDAD CRÓNICA POR ESTREPTOMICINA EN EL SISTEMA VESTIBULAR EN RATA

CAPÍTULO IIA MODELO DE ESTREPTOMICINA DE UNA INYECCIÓN DIARIA

2a.1 Efecto de la exposición diaria a estreptomicina durante seis semanas en el peso corporal

Con el objetivo de estudiar los procesos de degeneración vestibular asociados al tratamiento crónico con este antibiótico, ratas Long Evans fueron tratadas con estreptomicina a diferentes dosis y tiempos. Se siguió el modelo animal propuesto en Granados y Meza. (2005), pero administrando el fármaco de forma subcutánea en vez de intramuscular para reducir el sufrimiento animal. Se utilizaron las dosis de 100, 300, 400, 500 mg/kg, y la estreptomicina fue administrada durante 6 o 8 semanas una vez al día. Las dosis por debajo de 500mg/kg no provocaron una disfunción vestibular marcada (datos no mostrados) y la dosis de 600 mg/kg fue demasiado agresiva, comprometiendo la supervivencia de los animales del estudio. En base a estos resultados, se seleccionó la dosis de 500mg/kg como dosis de referencia para la caracterización del modelo.

Una vez establecida la dosis de trabajo, la primera aproximación fue el tratamiento durante 6 semanas. La Figura R26 muestra el efecto de la estreptomicina en el peso corporal de machos y hembras. Los animales ganaron peso con normalidad como se puede observar en la gráfica, pero aquellos que fueron tratados lo hicieron a un ritmo más bajo. En la sexta semana ambos sexos revelaron una reducción del peso, del 12.5% en machos y 8.7% en hembras, respecto a los controles de su mismo sexo.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en ambos sexos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del peso corporal de machos y hembras a lo largo del tiempo (F (1.276, 26.787): 2840.178, $p = 0.000$ y F (1.039, 5.195): 107.857, $p = 0.000$, respectivamente), a causa del tratamiento únicamente en machos (F (1,21): 8.026, $p = 0.010$ y F (1, 5): 0.037, $p = 0.856$, respectivamente) y en la interacción entre tiempo y tratamiento de nuevo únicamente en machos (F (1.276, 26.787): 18.733, $p = 0.000$ y F (1.039, 5.195): 1.221, $p = 0.321$, respectivamente).

Peso corporal durante 6 semanas de tratamiento

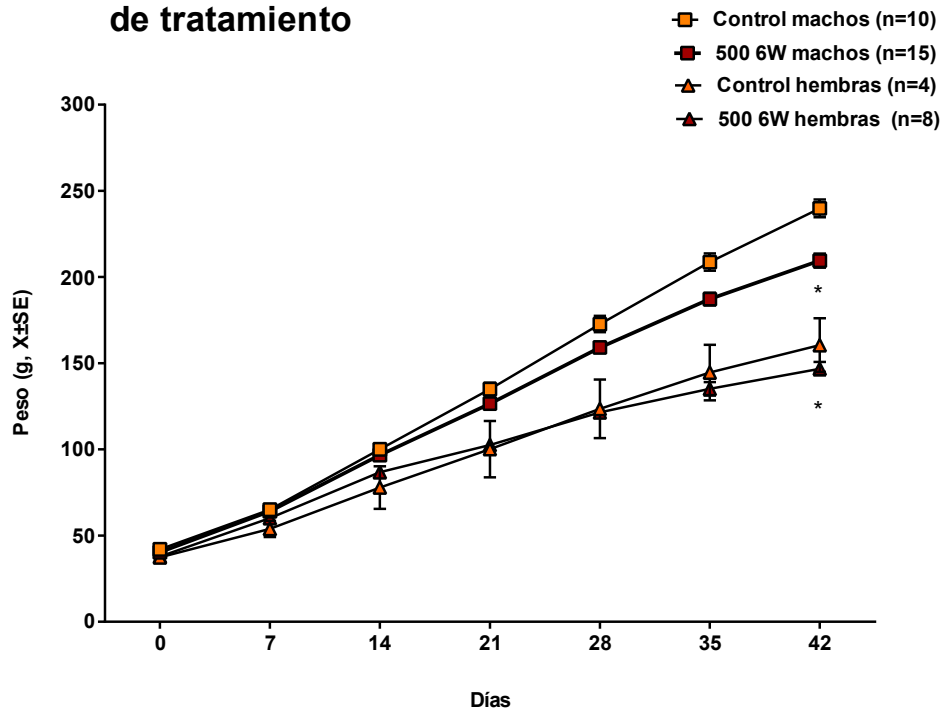


Figura R26. Efectos de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 6 semanas en el peso corporal. La gráfica muestra la media de peso ($X \pm SE$) según el sexo y el tratamiento: control machos, control hembras, 500mg/kg 6W machos y 500mg/kg 6W hembras. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control del mismo sexo, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados con estreptomicina a la dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas.

2a.2 Efecto de la exposición diaria a estreptomicina durante seis semanas en la función vestibular

Las ratas tratadas empezaron a manifestar signos de disfunción vestibular a partir de la tercera semana de tratamiento. Ésta se manifestó en una caída gradual del ángulo de tail-lift, que progresó hasta la sexta semana, donde se registraron ángulos en los animales tratados por debajo de los 100 grados en comparación a los 150 de los controles. No se observaron diferencias entre machos y hembras en las evaluaciones (Figura R27).

La prueba MANOVA de medidas repetidas en ambos sexos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en machos y hembras en el ángulo a lo largo del tiempo ($F(3.538, 159.195): 17.597, p = 0.000$ y $F(2.507, 12.537): 11.040, p = 0.001$, respectivamente), a causa del tratamiento ($F(1, 45): 11.267, p = 0.002$ y $F(1, 5): 6.850, p = 0.047$, respectivamente) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(3.538, 159.195): 8.308, p = 0.000$ y $F(2.507, 12.537): 10.979, p = 0.001$, respectivamente).

Análisis de tail-lift durante 6 semanas de tratamiento

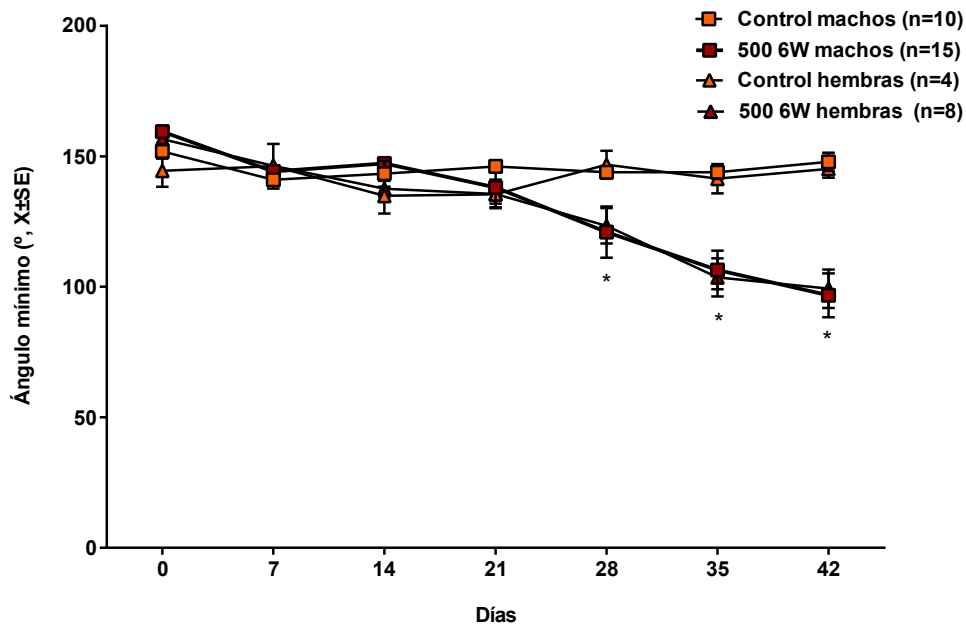


Figura R27. Efectos de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 6 semanas en el ángulo mínimo del reflejo tail-lift. La gráfica muestra la media del ángulo ($X \pm SE$) según el sexo y el tratamiento: control machos, control hembras, 500mg/kg 6W machos y 500mg/kg 6W hembras. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control del mismo sexo, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales control tratados con PBS y 500 6W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas.

Las ratas toleraron bien el tratamiento, y exceptuando su menor peso corporal y disfunción vestibular, la apariencia de éstas fue muy similar a la de los controles. En cambio, durante los minutos posteriores a la administración, las ratas entraban en un estado de letargia por el efecto agudo inmediato del fármaco. Estos síntomas se prolongaban hasta los veinte minutos post administración.

2a.3 Efecto de la exposición diaria a estreptomicina durante ocho semanas en el peso corporal

Con el objetivo de incrementar la disfunción vestibular provocada por la estreptomicina, otro grupo de ratas fue tratado durante 8 semanas a esta misma dosis. La Figura R28 muestra el efecto del tratamiento durante este tiempo en el peso corporal de machos y hembras. Del mismo modo que en resultados anteriores, los animales ganaron peso con normalidad, pero los tratados a un ritmo más lento. Para la octava semana los machos y hembras mostraban diferencias del 21.6% y 15.6% respectivamente en relación con los controles de su mismo sexo. Las ratas toleraron bien el tratamiento y mostraron una buena apariencia a pesar de su menor tamaño.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en ambos sexos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del peso corporal de machos y hembras a lo largo del tiempo ($F(1.232, 11.089): 2568.807, p = 0.000$ y $F(1.662, 6.647): 863.563, p = 0.000$, respectivamente), a causa del tratamiento únicamente en machos ($F(1,9): 28.217, p = 0.000$ y $F(1, 4): 5.368, p = 0.081$, respectivamente) y en la interacción entre tiempo y tratamiento en ambos sexos ($F(1.232, 11.089): 48.019, p = 0.000$ y $F(1.662, 6.647): 13.594, p = 0.000$, respectivamente).

Peso corporal durante 8 semanas de tratamiento

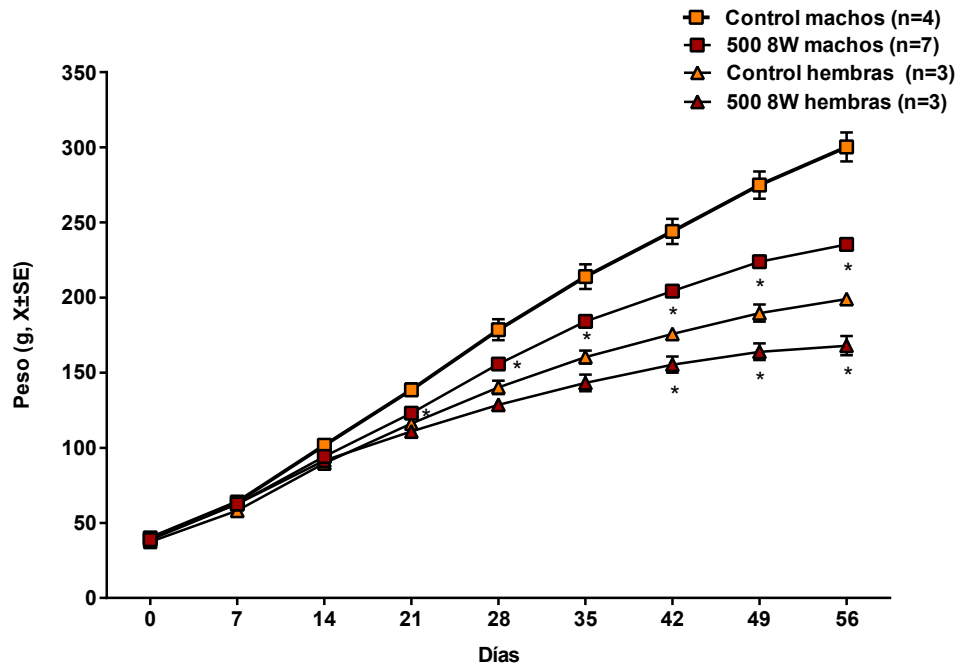


Figura R28. Efectos de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 8 semanas en el peso corporal. La gráfica muestra la media de peso ($X \pm SE$) según el sexo y el tratamiento: control machos, control hembras, 500mg/kg 8W machos y 500mg/kg 8W hembras. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control del mismo sexo, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales control tratados con PBS y 500 8W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 8 semanas.

2a.4 Efecto de la exposición a estreptomicina durante ocho semanas en la función vestibular

En cuanto al comportamiento, tal y como se observó en el experimento anterior, las ratas empezaron a exhibir una reducción progresiva del ángulo a partir de la tercera semana. Curiosamente, los niveles de ángulo obtenidos a las 8 semanas fueron muy similares a los de las ratas tratadas durante 6. De nuevo, no se observaron diferencias entre machos y hembras (Figura R29).

La prueba MANOVA de medidas repetidas en ambos sexos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del ángulo de machos y hembras a lo largo del tiempo ($F(3.398, 30.581): 3.510, p = 0.023$ y $F(2.548, 15.286): 4.420, p = 0.024$, respectivamente), a causa del tratamiento ($F(1,9): 12.292, p = 0.007$ y $F(1, 6): 5.765, p = 0.048$, respectivamente) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(3.398, 30.581): 4.748, p = 0.006$ y $F(2.548, 15.286): 5.446, p = 0.012$, respectivamente).

Análisis de tail-lift durante 8 semanas de tratamiento

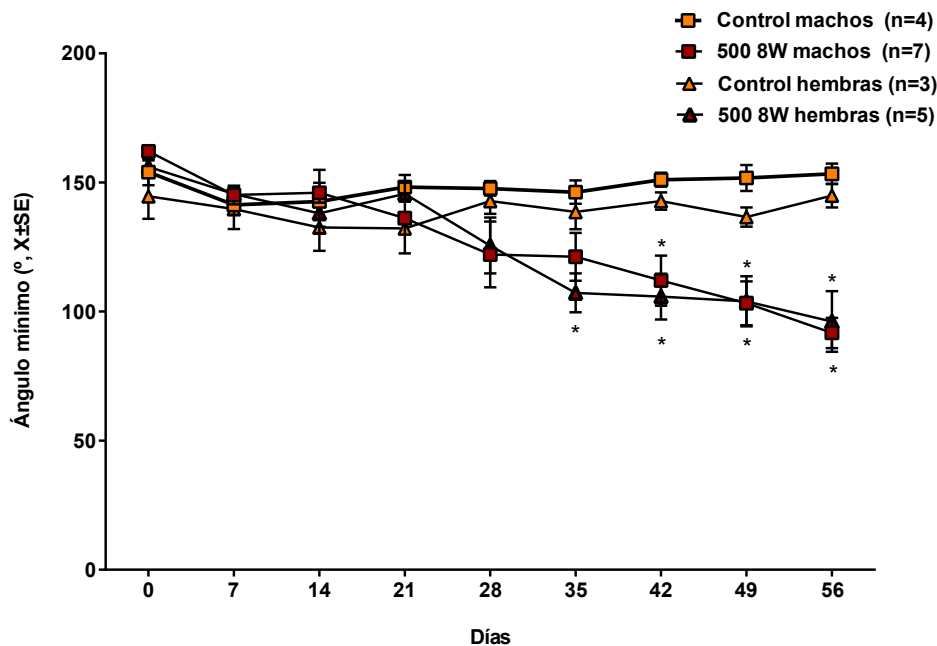


Figura R29. Efectos de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 8 semanas en el ángulo mínimo del reflejo tail-lift. La gráfica muestra la media del ángulo ($X \pm SE$) según el sexo y el tratamiento: control machos, control hembras, 500mg/kg 8W machos y 500mg/kg 8W hembras. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control del mismo sexo, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales control tratados con PBS y 500 8W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 8 semanas

2a.5 Análisis de la recuperación tras seis semanas de tratamiento

En el modelo de IDPN están bien caracterizados los periodos de tratamiento a partir de los cuales se consigue o no una recuperación completa tras la suspensión del tratamiento (Sedó-Cabezón et al, 2015). En el modelo de estreptomicina también se quiso evaluar la capacidad de recuperación de la ratas tras 6 semanas de exposición al fármaco.

Las Figuras R30 y R31 muestran respectivamente la evaluación de peso corporal y funcional de ratas a las que se administró estreptomicina durante 6 semanas y tuvieron posteriormente 10 semanas de recuperación. Para el final del experimento, éstas alcanzaron un peso similar al de los controles y manifestaron una recuperación vestibular completa a las tres semanas de haber interrumpido el tratamiento.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en machos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del peso corporal a lo largo del tiempo ($F(1.375, 5.501): 624.318, p = 0.023$), pero no a causa del tratamiento ($F(1, 4): 1.662, p = 0.267$) ni en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(1.375, 5.501): 1.769, p = 0.247$).

Peso en machos recuperación tras 6 semanas de tratamiento

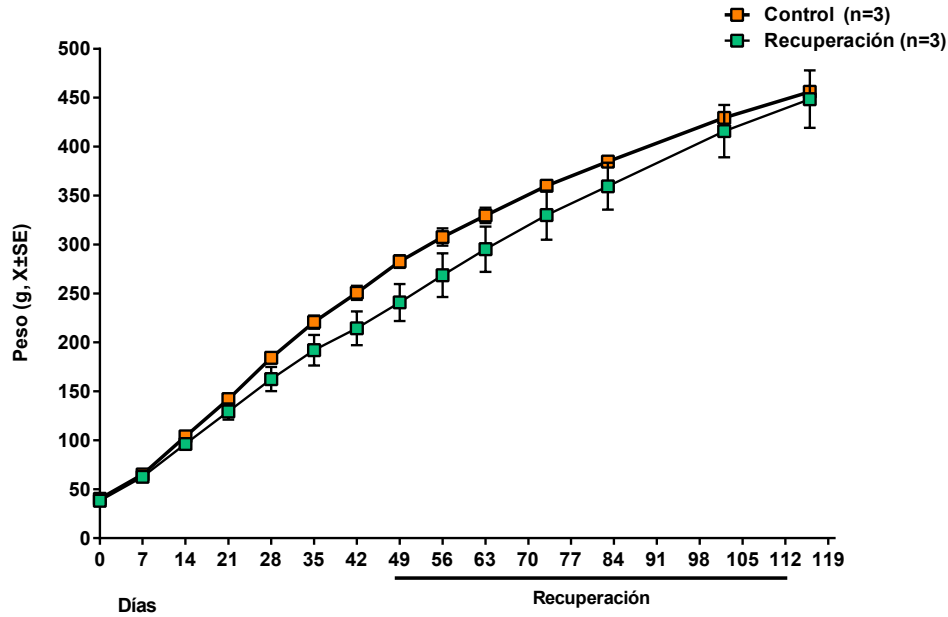


Figura R30. Efectos en el peso corporal de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 6 semanas con un periodo de recuperación de 10 semanas. La gráfica muestra la media de peso ($X \pm SE$) de tres machos por grupo. Aparece el periodo de recuperación señalado en la parte inferior de la gráfica con una línea. Control: animales control tratados con PBS y Recuperación: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas seguido de un periodo de recuperación de 10 semanas.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en machos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del ángulo mínimo a lo largo del tiempo ($F(3.035, 12.139): 5.343, p = 0.014$), a causa del tratamiento ($F(1, 4): 11.211, p = 0.029$) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(3.035, 12.139): 7.066, p = 0.005$).

Análisis de tail-lift en machos recuperación tras 6 semanas de tratamiento

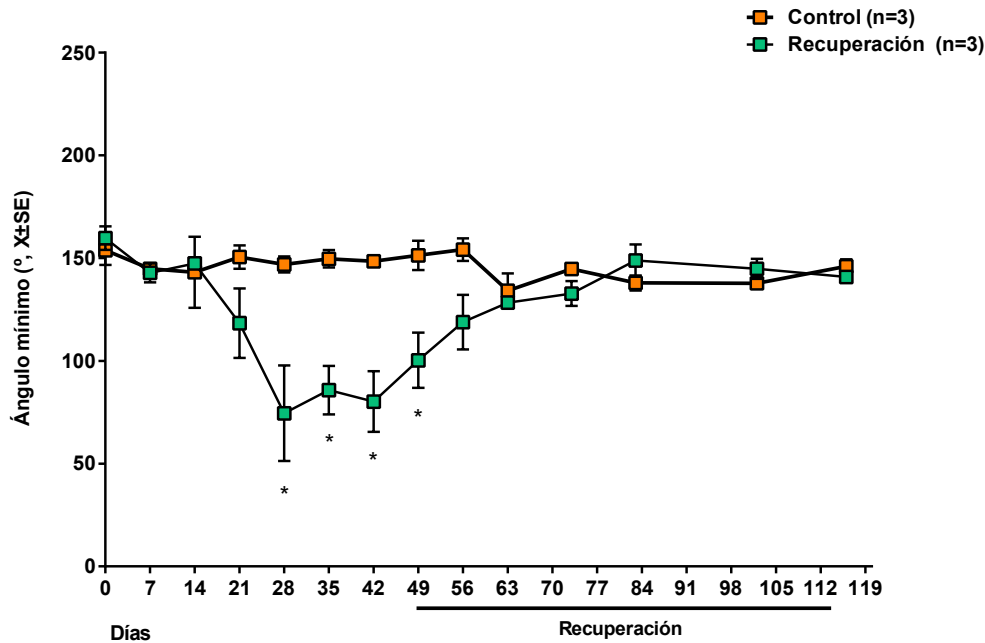


Figura R31. Efectos en el ángulo mínimo del reflejo tail-lift de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 6 semanas con un periodo de recuperación de 10 semanas. La gráfica muestra la media del ángulo mínimo ($X \pm SE$) de tres machos por grupo. Aparece el periodo de recuperación señalado en la parte inferior de la gráfica con una línea. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales control tratados con PBS y Recuperación: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas seguido de un periodo de recuperación de 10 semanas.

2a.6 Análisis de la recuperación tras ocho semanas de tratamiento

Una vez comprobada la capacidad de recuperación de las ratas tras 6 semanas de tratamiento, se estudió la recuperación de los animales a los que se les alargó a 8 semanas. Las Figuras R32 y R33 presentan la evaluación de peso corporal en machos y hembras, respectivamente, que fueron tratados durante 8 semanas y tuvieron un tiempo de recuperación también de 8 semanas. Las ratas mantuvieron un peso ligeramente inferior a los controles de su mismo sexo durante todo el experimento.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en machos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del peso corporal a lo largo del tiempo ($F(1.570, 6.279): 1784.293, p = 0.000$), a causa del tratamiento ($F(1, 4): 79.952, p = 0.001$) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(1.570, 6.279): 17.727, p = 0.000$).

No se pudo realizar el análisis estadístico en hembras debido al bajo número de animales por grupo.

Peso recuperación en machos tras 8 semanas de tratamiento

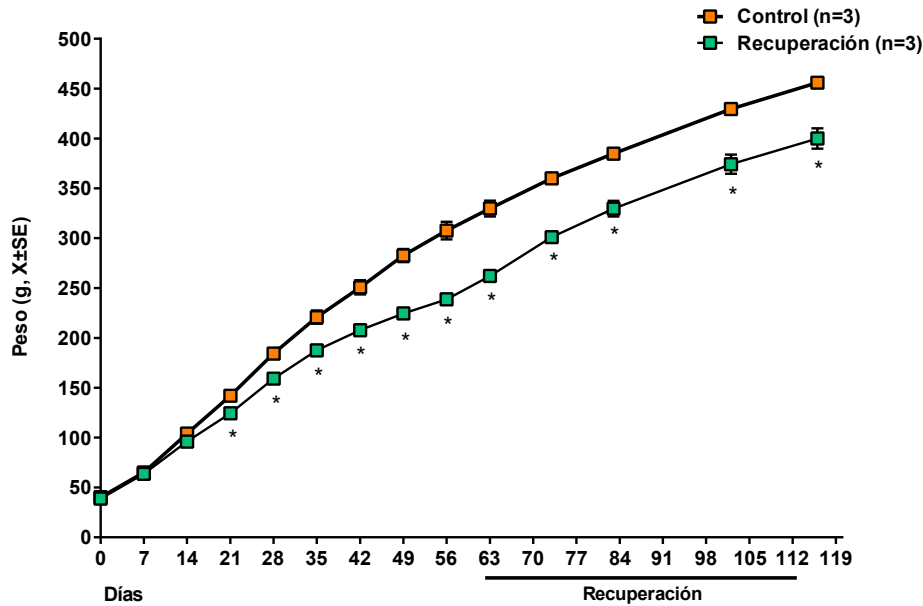


Figura R32. Efectos en el peso corporal de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 semanas. La gráfica muestra la media de peso ($X \pm SE$) de tres machos por grupo. Aparece el periodo de recuperación señalado en la parte inferior de la gráfica con una línea. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales control tratados con PBS y Recuperación: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 8 semanas seguido de un periodo de recuperación de 8 semanas.

Peso recuperación en hembras tras 8 semanas de tratamiento

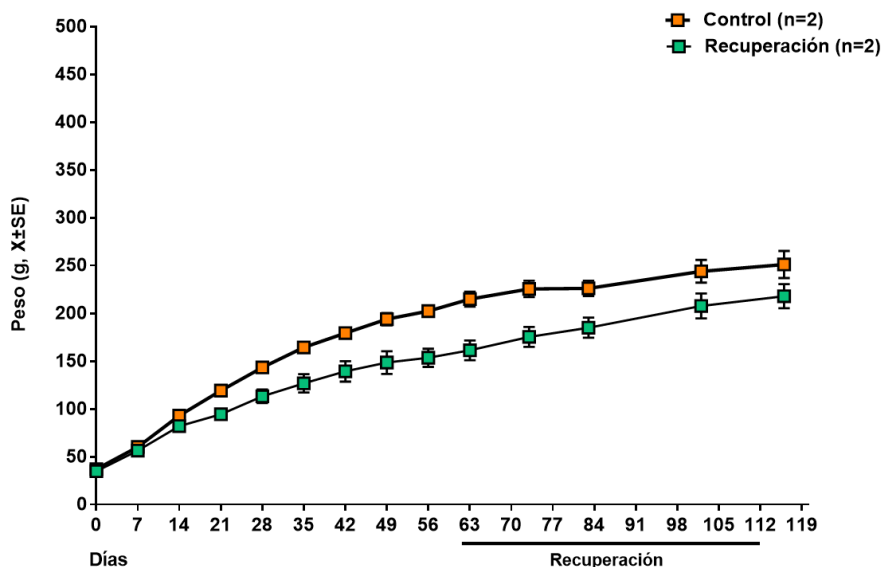


Figura R33. Efectos en el peso corporal de la administración crónica de estreptomicina a una dosis de 500mg/kg subcutánea una vez al día durante 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 semanas. La gráfica muestra la media de peso ($X \pm SE$) de dos hembras por grupo. Aparece el periodo de recuperación señalado en la parte inferior de la gráfica con una línea. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales control tratados con PBS y Recuperación: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 8 semanas seguido de un periodo de recuperación de 8 semanas.

En la Figura R34 se puede observar el análisis de comportamiento en las ratas a las que se les suspendió el tratamiento. Debido a la afectación funcional similar en machos y hembras, se realizó un análisis conjunto de ambos sexos. Del mismo modo que en el experimento anterior, éstas también mostraron una recuperación vestibular completa a las tres semanas de haber interrumpido el tratamiento, con ángulos similares a los controles.

La prueba MANOVA de medidas repetidas del conjunto de machos y hembras recuperación con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del ángulo mínimo a lo largo del tiempo ($F(4.407, 35.253): 4.644, p = 0.003$), a causa del tratamiento ($F(1, 8): 11.002, p = 0.011$) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(4.407, 35.253): 5.288, p = 0.001$).

Análisis de tail-lift en machos y hembras recuperación tras 8 semanas de tratamiento

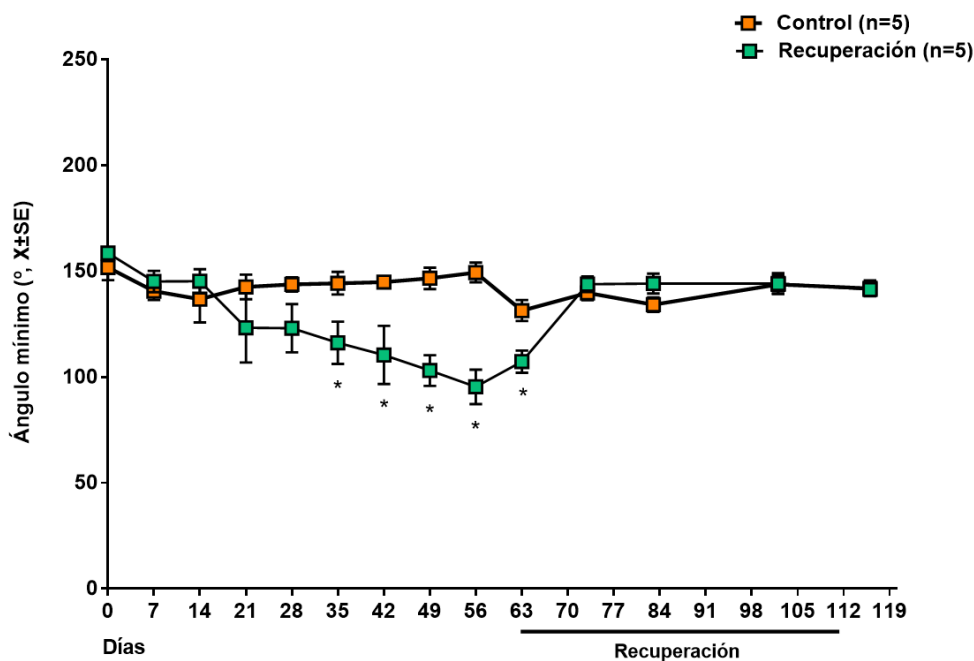


Figura R34. Efectos en el reflejo tail-lift de la administración crónica de estreptomicina a 500mg/kg a nivel subcutáneo una vez al día durante 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 semanas. Se incluyeron en el análisis machos y hembras. La gráfica muestra la media del ángulo mínimo ($X \pm SE$) de cinco animales por grupo. Aparece el periodo de recuperación señalado en la parte inferior de la gráfica con una línea. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Control: animales tratados con PBS; Recuperación: animales tratados con estreptomicina a la dosis de 500mg/kg una vez al día durante 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 semanas.

2a.7 Ultraestructura de los epitelios vestibulares: TEM y SEM

Para poder estudiar más en detalle la lesión ocasionada por la exposición a estreptomicina, se procesaron los tejidos vestibulares de las ratas tratadas y control para su posterior observación por microscopía electrónica. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron una apariencia similar en tratados y controles para los tres tejidos vestibulares, con evidencias de pérdida celular leve o moderada en determinadas zonas (Figura R35). En contraposición, no se encontraron células extruidas o en proceso de hacerlo y la afectación fue aparentemente similar para los tres epitelios: cresta, utrículo y sáculo.

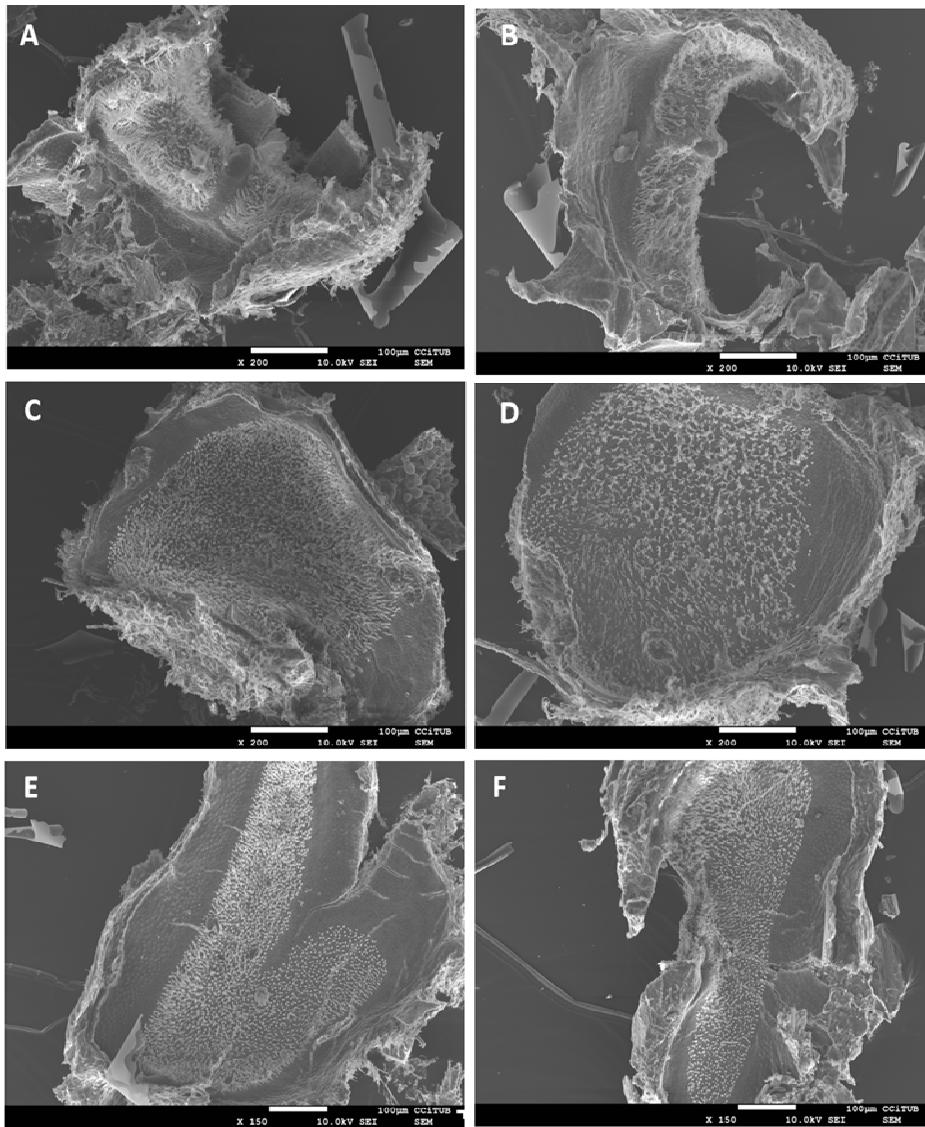


Figura R35. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de cresta, utrículo y sáculo de animales control (A, C y E respectivamente) y expuestos a estreptomicina a 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas (B, D y F respectivamente). Las tres imágenes de cada grupo experimental corresponden al mismo animal control y tratado, obteniendo este último un ángulo de 77 grados en el análisis de comportamiento tail-lift.

La mayoría de las células no presentaron anomalías en los cilios, mostrando una morfología similar a los controles. En zonas de gran pérdida celular se encontraron esporádicamente algunos en fusión (Figura R36).

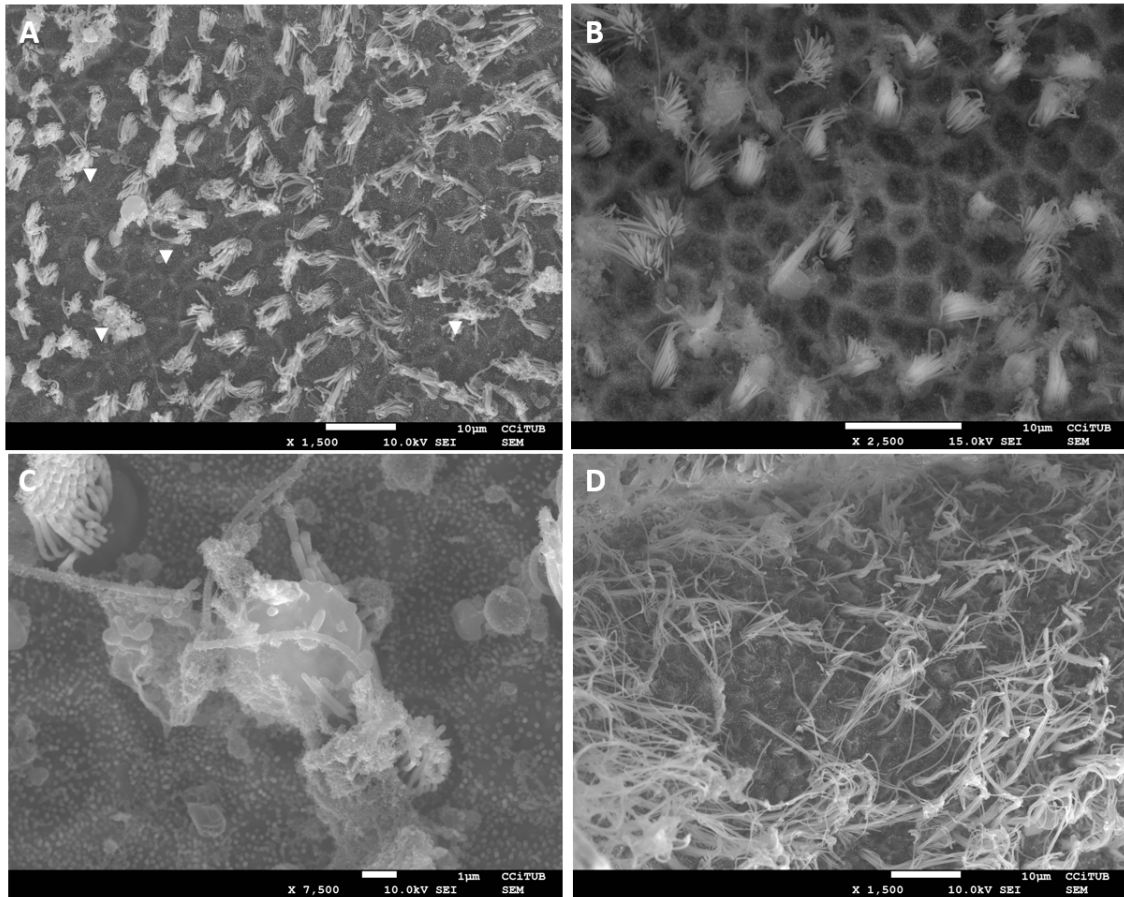


Figura R36. Imágenes a mayor aumento de microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se pueden apreciar huecos, signo de pérdida de células ciliadas (A, B, D) y alguna evidencia de patología celular (C). La morfología de los haces de estereocilios fue normal a excepción de la aparición esporádica de algunos fusionados (A y C). Las imágenes corresponden utrículo (A), sáculo (B-C) y cresta (D) de un animal tratado con estreptomycin durante 6 semanas con un ángulo de 104 en el análisis de comportamiento tail-lift. Las flechas blancas de la primera imagen indican regiones donde ha habido pérdida de células.

Para estudiar en profundidad el estado en el que se encontraban las células de los tejidos, se observaron crestas de animales control y tratados por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las células de los animales tratados no manifestaron signos de extrusión ni apoptosis, con la aparición esporádica de células vacuolizadas. Las uniones caliciales entre las células ciliadas y las neuronas mostraron pérdidas de electrodensidad en algunos puntos de la unión calicial (Figura R37). En condiciones normales, la membrana interna de los cálices es más electrodensa que la externa debido a la presencia de proteínas de adhesión. A causa del tratamiento, existe un desmantelamiento de los cálices que provoca que ambas membranas muestren la misma apariencia, fenómeno también observado en el modelo de IDPN (Sedó-Cabezón et al, 2015).

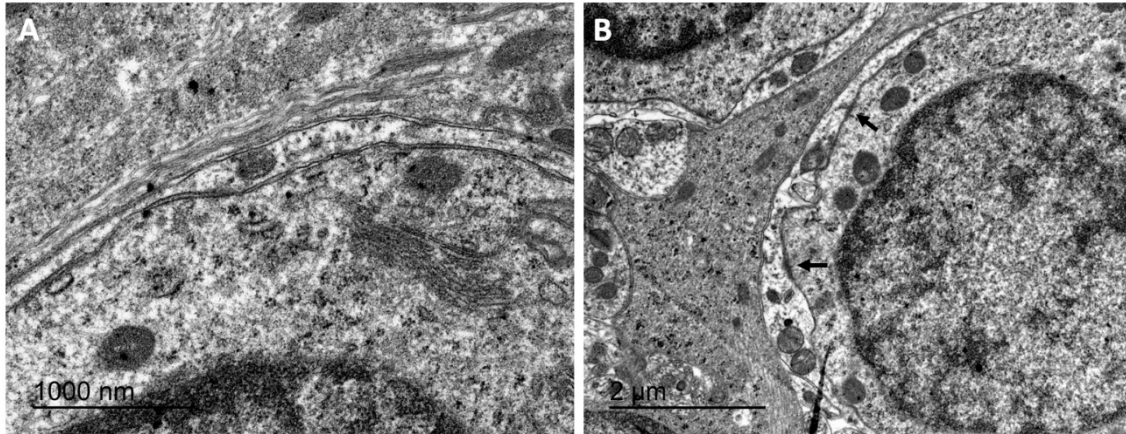


Figura R37. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de ratas tratadas durante 6 semanas con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg. A: Pérdida completa de electrodensidad en la región calicial a causa del tratamiento B: Pérdida parcial de electrodensidad en las uniones caliciales entre la neurona y la célula ciliada. Las flechas negras de la imagen indican las zonas en las que se conserva la unión entre ambas. Las imágenes corresponden a la cresta de un animal tratado con un ángulo mínimo de 77 en análisis de comportamiento tail-lift.

2a.8 Efecto de la estreptomicina sobre el número de células ciliadas

En las imágenes de microscopía electrónica de barrido se evidenció una clara pérdida de células ciliadas. Con el objetivo de conocer más en detalle la pérdida celular, se procesaron crestas, utrículos y sáculos de animales control, tratados y recuperación por inmunohistoquímica para un posterior recuento de células. Los marcajes utilizados para el recuento fueron los siguientes: Caspr1 para identificar las células ciliadas de tipo I, calretinina para las células ciliadas de tipo II y Myo7a como identificativo de todas las células ciliadas.

La Figura R38 muestra los recuentos de células de tipo I y II en las ratas control y tratadas tanto en las zonas centrales como periféricas para los tres epitelios sensoriales vestibulares.

En los animales tratados hubo una pérdida significativa de HCl en la zona periférica y central de la cresta, zona periférica y estriolar del utrículo y periferia del sáculo. Los recuentos de las ratas expuestas a 6 o 8 semanas fueron muy similares, y el promedio de las pérdidas de ambos grupos con relación a los controles fueron del 34.1% y 37.3% en cresta, 65.7% y 53.5% en utrículo y 42.7% en sáculo para las zonas periféricas y centrales/estriolares respectivamente.

No se observaron diferencias significativas entre los animales tratados durante 6 o 8 semanas ni tampoco con los de recuperación. Este hecho corrobora la pérdida funcional similar observada en ambos grupos de tratamiento y demuestra la irreversible pérdida celular que causa el antibiótico.

El número de HCII se mantuvo prácticamente invariable en las cuatro condiciones experimentales, y para los diferentes epitelios sensoriales y zonas estudiadas. Tal y como se vio anteriormente con el IDPN, estas células exhibieron una mayor resistencia que las HCl al tratamiento.

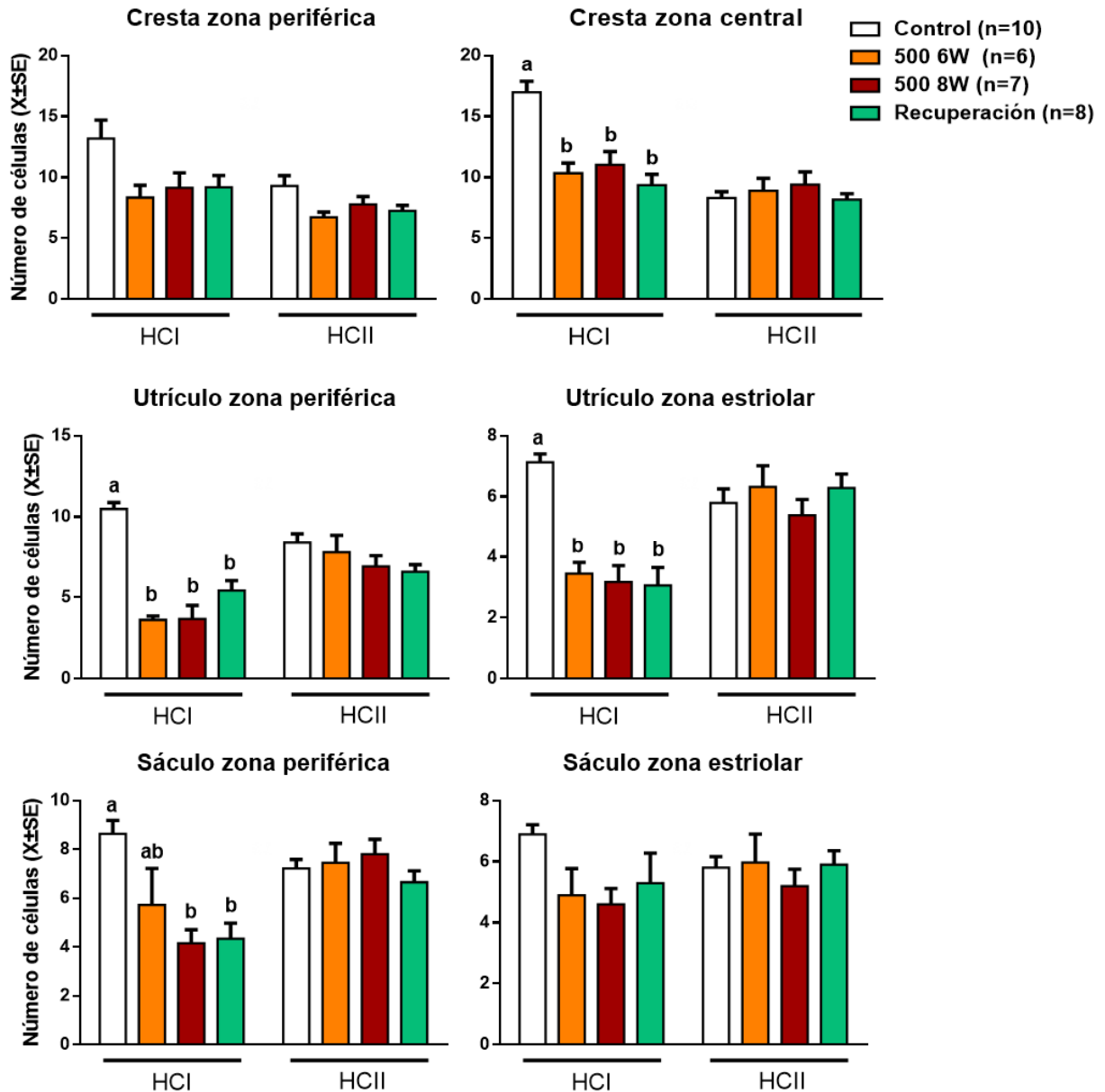


Figura R38. Pérdida de células ciliadas tipo I (HCI) y tipo II (HCII) después de la exposición a estreptomicina subcutánea una vez al día, datos mostrados en función del tratamiento: control, 500mg/kg 6W, 500mg/kg 8W y recuperación, ver leyenda. Los datos aparecen también en función de la zona (central / estriola y periferia) y epitelio vestibular (cresta, utrículo y sáculo). Se incluyeron en el análisis machos y hembras. Se ha utilizado Caspr1 para identificar las células ciliadas de tipo I, calretinina para las células ciliadas de tipo II y Myo7a como identificativo de todas las células ciliadas. Los gráficos de barras señalan los recuentos de HCI y HCII ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular, la región dentro de él y el tratamiento. El grosor de cada imagen fue de $0.5 \mu\text{m}$ en un stack total de $25\mu\text{m}$. Los recuentos de células corresponden al número medio de células por cada $3 \mu\text{m}$ de epitelio sensorial. Las letras encima del gráfico de barras muestran qué grupos son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Cresta zona periférica: HCI F (3,24): 2.944 $p = 0.053$, HCII F (3,24): 2.489 $p = 0.085$. Cresta zona central: HCI F (3,27): 15.067 $p = 0.000$. HCII F (3,27): 0.583 $p = 0.631$. Utriculo zona periférica: HCI F (3,27): 37.348 $p = 0.000$, HCII: F (3,26): 1.861 $p = 0.161$. Utriculo zona estriolar: HCI F (3,26): 23.688 $p = 0.000$, HCII: F (3,24): 0.565 $p = 0.643$. Sáculo zona periférica: HCI F (3,21): 9.665 $p = 0.000$, HCII F (3,22): 0.799 $p = 0.508$. Sáculo zona estriolar: HCI F (3,19): 2.950 $p = 0.059$, HCII F (3,19): 0.425 $p = 0.737$. Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas; 500 8W: animales tratados durante 8 semanas y Recuperación: animales tratados 6 o 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 o 10 semanas.

2a.9 Efecto de la estreptomina en las uniones caliciales y análisis de Caspr1

En el modelo de IDPN se ha descrito la fragmentación y desaparición progresiva de las proteínas de adhesión presentes en las uniones entre las células ciliadas de tipo I y las neuronas (Sedó-Cabezón et al, 2015; Greguske et al., 2019). Este fenómeno de desconexión entre la célula sensorial con su aferente es paralelo a la pérdida gradual de función, donde el restablecimiento de la unión se ha observado en animales con una recuperación completa.

Caspr1 es una proteína de adhesión localizada en la zona del cáliz de la membrana neuronal postsináptica, y es clave para el mantenimiento de la unión entre las células ciliadas de tipo I y las neuronas (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011). Con el objetivo de evaluar la hipótesis de que la toxicidad crónica de la estreptomina también cursa con la pérdida de Caspr1 y fragmentación de los cálices, se procesaron los epitelios vestibulares por inmunohistoquímica. Posteriormente se cuantificó la fluorescencia de Caspr1 en los animales control, tratados y recuperación. El análisis se realizó en función del epitelio sensorial estudiado (cresta, utrículo y sáculo) y la zona (central/estriolar o periférica). Las muestras utilizadas fueron las mismas que las que se utilizaron en el recuento celular previamente expuesto.

En la Figura R39 se pueden observar las imágenes de los tres marcajes (Caspr1, Myo7a y calretinina) en animales control, tratados y recuperación. Los tratados presentaron unos cálices fragmentados (identificados a partir del marcaje por Caspr1) y en proceso de desaparición, con una pérdida total de la proteína en algunos animales.

Por otro lado, el marcaje de Myo7a también se mostró más tenue en las ratas expuestas a estreptomina, indicando unos niveles más bajos por el tratamiento. Myo7a se encuentra en el citoplasma de las células ciliadas y recientemente se le ha descrito una función importante tanto en el desarrollo como en la función ciliar en las células del oído interno (Kim et al., 2017).

Finalmente, se observó en las ratas que tuvieron un periodo de recuperación un restablecimiento total de la estructura calicial y unos niveles de fluorescencia de Myo7a más intensos.

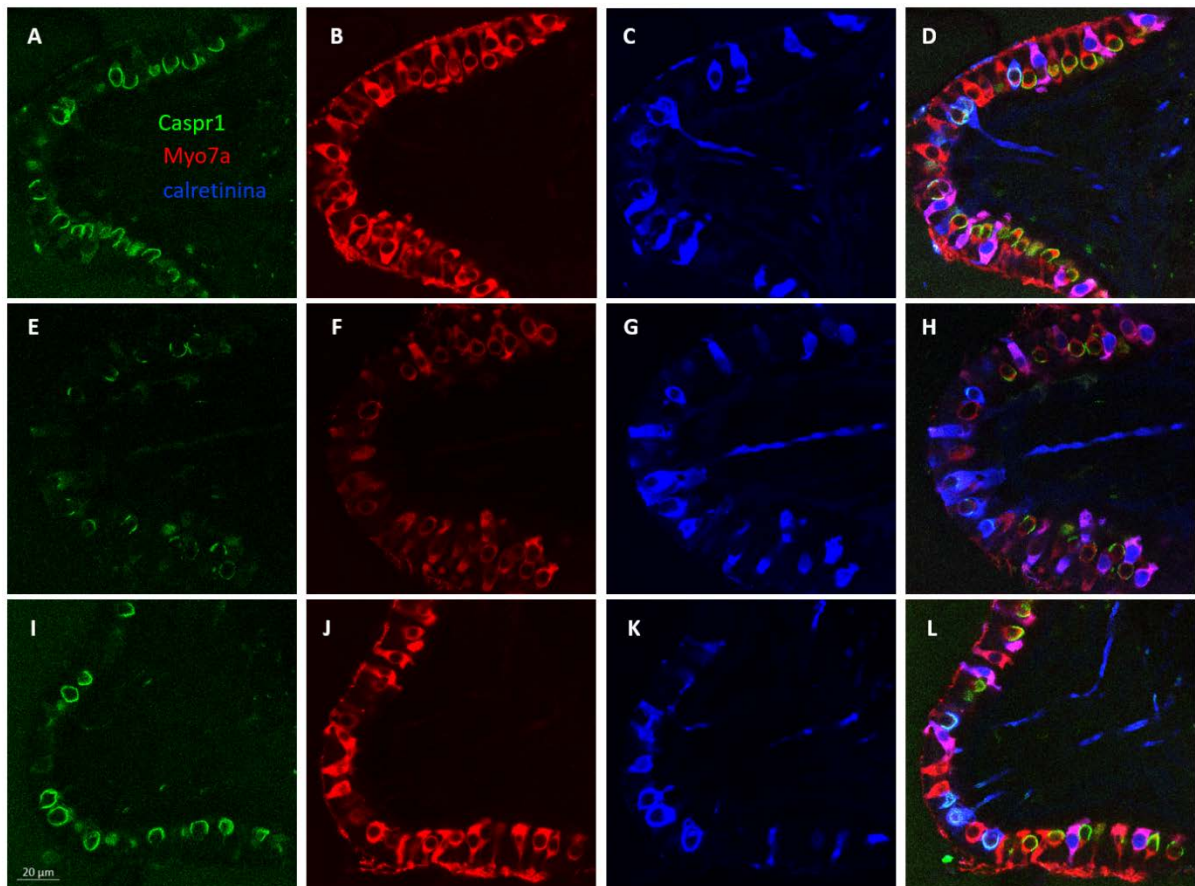


Figura R39. Efecto de la administración diaria de estreptomicina durante 6 semanas en las uniones caliciales. En las imágenes se muestran Caspr1 (verde: A, E e I), Myo7a (rojo: B, F y J) y calretinina (azul: C, G y K). En la columna de la derecha (D, H y L) aparecen conjuntamente los tres marcajes. A-D: Cresta de un individuo control. E-H: Cresta de animal expuesto a estreptomicina durante 6 semanas. I-J: Cresta de un animal expuesto a estreptomicina durante 6 semanas con 10 de recuperación.

En base a estas imágenes, se realizaron las cuantificaciones de Caspr1 y Myo7a. La Figura R40A demuestra la pérdida de la proteína Caspr1 en las zonas periféricas a causa del tratamiento. Se puede observar que las ratas tratadas durante 6 o 8 semanas presentan una reducción significativa de la fluorescencia en los cálces para todos los epitelios sensoriales vestibulares: cresta, utrículo y sáculo.

De forma paralela a los datos de comportamiento y recuento celular, los resultados de Caspr1 indican un efecto similar del tratamiento tras 6 o 8 semanas de tratamiento. A nivel cuantitativo, la pérdida media de fluorescencia de los cálces de los animales tratados fue de aproximadamente del 61, 59 y 64% en cresta, utrículo y sáculo respectivamente respecto a los controles.

Por otro lado, los cálces de las ratas recuperación registraron unos niveles de Caspr1 estadísticamente similares a la de los controles, con signos de un restablecimiento completo en la expresión de esta proteína.

Adicionalmente, se analizaron las zonas centrales en el caso de cresta, o estriolares en el utrículo y sáculo. Los resultados fueron muy similares a los mostrados en las zonas periféricas (Figura R40B), y a nivel cuantitativo, la pérdida media registrada en tratados volvió a ser de alrededor del 60% en los tres epitelios vestibulares.

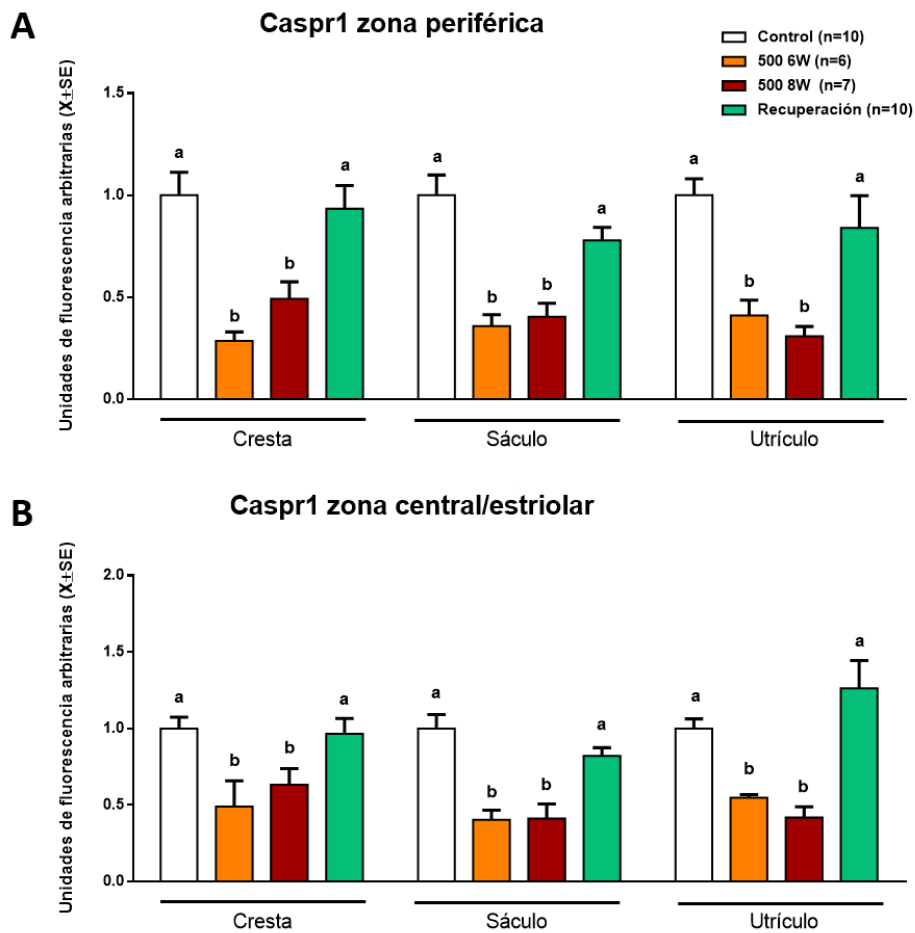


Figura R40. Efecto de la administración subcutánea de estreptomicina sobre la Caspr1 en las zonas periféricas (A) y centrales/estriolares (B) en cresta, sáculo y utrículo. Se han estudiado los grupos control, 500mg/kg durante 6 semanas, 500mg/kg durante 8 semanas y recuperación. Se incluyeron en el análisis machos y hembras. Se realizó la cuantificación de fluorescencia total media de 30 células por animal y el grosor de cada imagen fue de 0.5 μm en un stack total de 25 μm . Las letras encima del gráfico de barras indican qué muestras son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa (cresta: $F(3,26): 5.296 p = 0.006$, utrículo: $F(3,23): 10.301 p = 0.000$, sáculo: $F(3,19): 10.794 p = 0.000$). Control: animales tratados con PBS, 500 6W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas, 500 8W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 8 semanas y Recuperación: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 o 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 o 10 semanas.

2a.10 Análisis de Myo7a

Debido a la menor intensidad de Myo7a en las imágenes de inmunohistoquímica de los animales tratados, también se realizó la cuantificación de esta proteína. Los resultados (Figura R41) señalan un comportamiento paralelo a los observados en Caspr1. Las células ciliadas de los animales tratados registraron una reducción en la intensidad de fluorescencia del 35% respecto a controles y las ratas recuperación evidenciaron un restablecimiento completo de sus niveles.

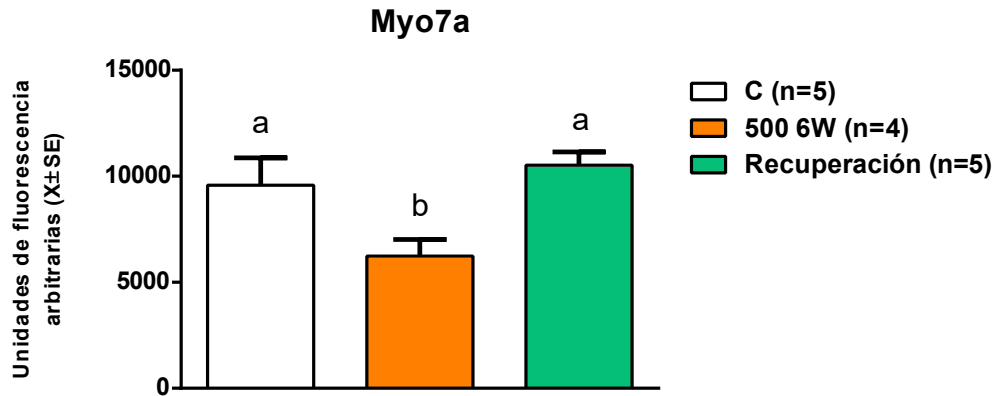


Figura R41. Efecto de la administración diaria de estreptomicina a 500mg/kg en la proteína Myo7a en cresta. Se compararon el grupo control, el grupo tratamiento y el de recuperación. Se incluyeron en el análisis machos y hembras. Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células por animal y el grosor de cada imagen fue de 0.5 μm en un stack total de 25 μm . Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa ($F(2,11): 4.997 p = 0.029$). Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados con 500 mg/kg de estreptomicina una vez al día durante 6 semanas; y Recuperación: animales tratados durante 6 o 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 o 10 semanas.

2a.11 Efecto de la estreptomicina sobre KCNQ4

KCNQ4 es un canal de potasio dependiente de voltaje que se encuentra contenido en la membrana postsináptica de los cálices en presencia de Caspr1, colocalizando con ella (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011). En ausencia de Caspr1, en cambio, KCNQ4 deja de estar presente únicamente en la región calicial y se redistribuye a lo largo de toda la membrana aferente (Sousa et al., 2009; Sedó-Cabezón et al., 2015).

Con el objetivo de evaluar si la estreptomicina induce cambios en el patrón de expresión de KCNQ4, se procesaron crestas de animales control, tratados y recuperación por inmunohistoquímica siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente en el estudio de Caspr1.

Los marcajes en el análisis de inmunohistoquímica fueron los siguientes: Caspr1 para identificar los cálices y KCNQ4 para el canal de potasio. La Figura R42 presenta las imágenes de fluorescencia de KCNQ4 y Caspr1, donde se observa la deslocalización del canal en las células marcadas con una flecha. En la Figura R43 se muestran imágenes ampliadas donde se aprecia con mayor claridad la redistribución de KCNQ4 en las células afectadas.

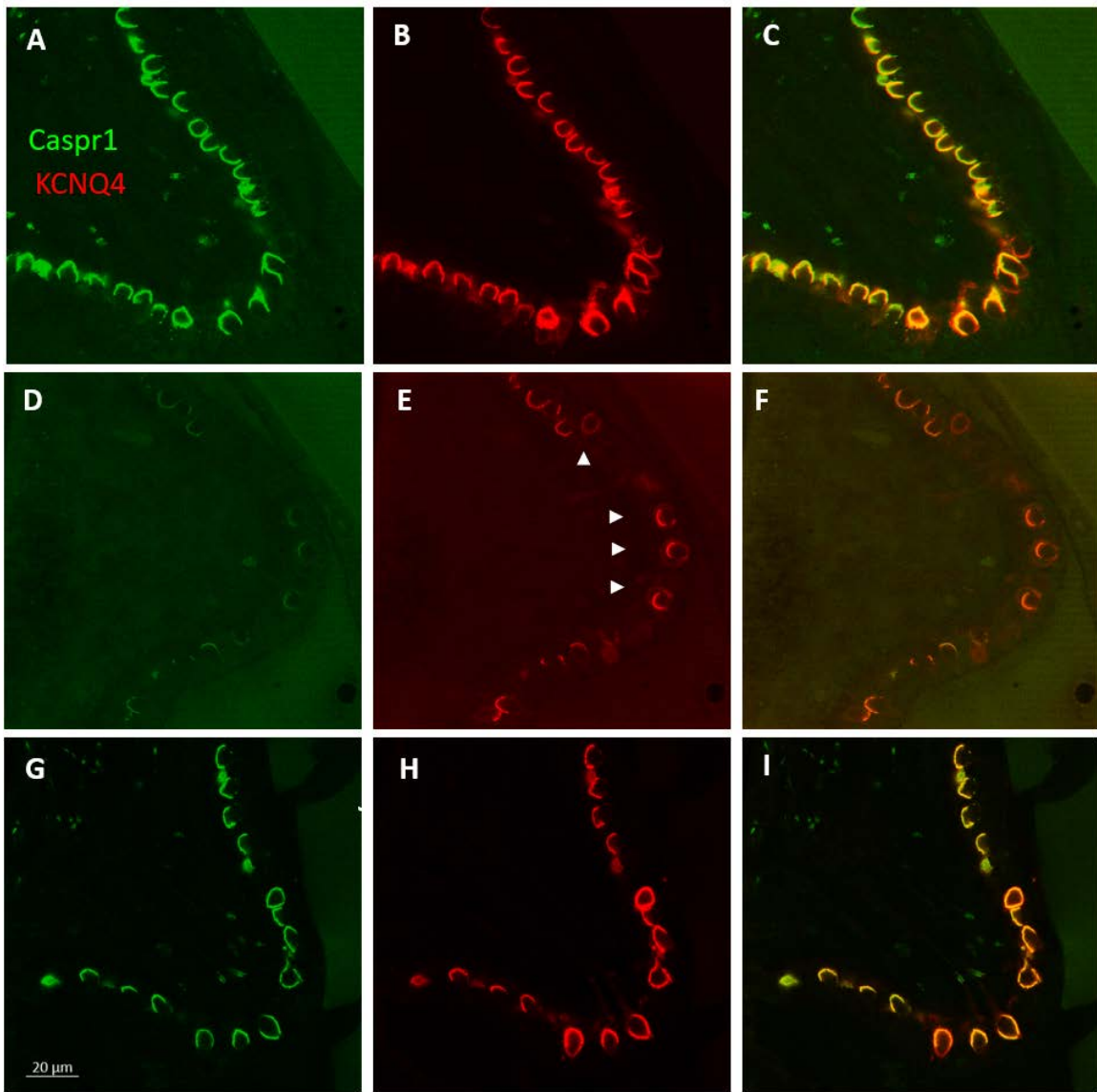


Figura R42. Efecto de la administración diaria de estreptomicina durante 6 semanas en la localización del canal de potasio KCNQ4. En las imágenes aparecen Caspr1 (verde: A, D y G), KCNQ4 (rojo: B, E y H) y ambas proteínas (C, F y I). A-C: Cresta de un individuo control. D-F: Cresta de un animal expuesto a 500 mg/kg al día de estreptomicina durante 6 semanas. G-I: Cresta de animal expuesto a estreptomicina durante 6 semanas con 10 semanas de recuperación. Se han marcado con flechas las células donde se aprecia la deslocalización de KCNQ4.

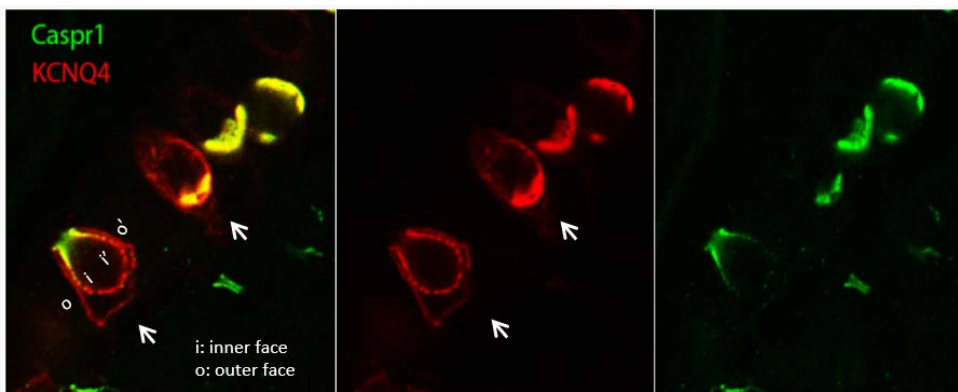


Figura R43. Deslocalización de la proteína KCNQ4 a causa del tratamiento con estreptomicina. En las células señalada con una flecha se empieza a perder la Caspr1 y con ello, la redistribución de KCNQ4 por toda la membrana aferente. La célula señalada más a la izquierda exhibe una desaparición extensiva de la Caspr1 y KCNQ4 se encuentra presente en las caras internas (i) y externas (o) de los cálces.

El siguiente paso fue realizar un análisis cuantitativo de la fluorescencia en las caras internas (correspondiente a la unión calicial) y externas de la membrana de los cálices, para estudiar así la deslocalización de KCNQ4. La Figura R44 señala una disminución de fluorescencia en la cara interna y un aumento en la cara externa de las HCl de los animales tratado en relación con los controles. La reducción en la fluorescencia de la cara interna para los tratados fue de alrededor del 44% (como media entre ambos tiempos de tratamiento) y éstos presentaron aproximadamente 20 veces más intensidad de fluorescencia en la cara externa. Por último, los animales recuperación tuvieron un restablecimiento completo en el patrón de expresión de KCNQ4.

Los resultados indican una redistribución de KCNQ4 por el tratamiento, pasando de estar contenido en la región de la unión calicial, a tener una localización anómala a lo largo de toda la membrana de la neurona.

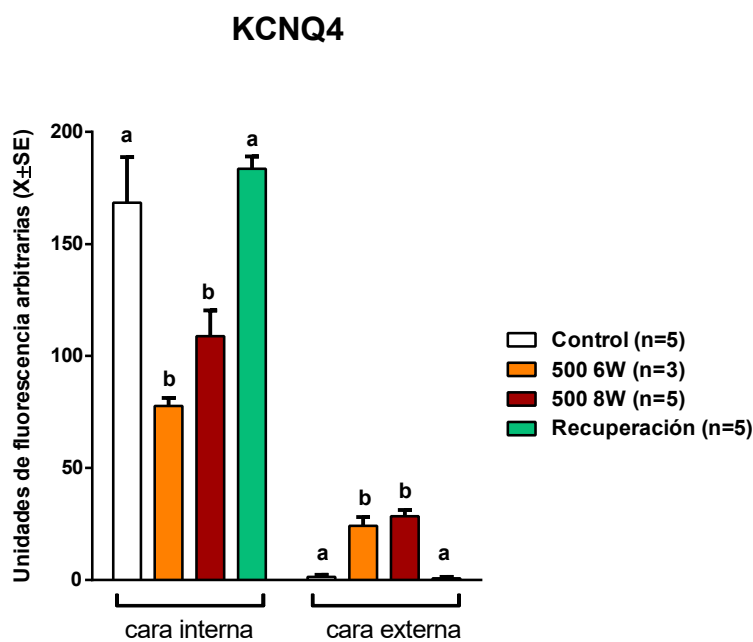


Figura R44. Efecto de la administración subcutánea de estreptomina a 500mg/kg durante 6, o 8 semanas en el patrón de expresión de KCNQ4 en las HCl. El análisis se representa como una cuantificación de la fluorescencia en las caras interna y externa de los cálices entre los grupos control, 500mg/kg 6W, 500mg/kg 8W y recuperación. Se incluyeron en el análisis machos y hembras. El grosor de cada imagen fue de 0.5 μm en un stack total de 25 μm . Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa (cara interna: $F(3,14): 12.064 p = 0.000$ y cara externa: $F(3,14): 49.882 p = 0.000$). Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados diariamente con 500 mg/kg de estreptomina durante 6 semanas; 500 8W: animales tratados durante 8 semanas; y Recuperación: animales tratados durante 6 o 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 o 10 semanas.

2a.12 Análisis molecular del desacoplamiento sináptico tras el tratamiento con estreptomina

Estudios anteriores de nuestro laboratorio han demostrado que tras la exposición crónica a IDPN existe un desacoplamiento sináptico entre la célula ciliada y la neurona. Este hecho proporciona una explicación a la pérdida funcional reversible que existe tras el tratamiento. (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019).

Una vez demostrado que la estreptomina induce una pérdida de unión entre la célula ciliada y la neurona mediante la pérdida de Caspr1, se estudió el estado de su sinapsis. Para ello, se

procesaron crestas por inmunohistoquímica con el marcaje de la proteína presináptica Ribeye y la proteína postsináptica PSD95, además de calretinina y Myo7a para facilitar el reconocimiento de las células ciliadas.

Las imágenes de inmunohistoquímica para los cuatro marcadores en cresta se pueden observar en la Figura R45. Aunque a simple vista estas imágenes muestren una apariencia global similar entre controles y tratados, su análisis cuantitativo posterior reveló la existencia de alteraciones en el número de densidades pre y post sinápticas.

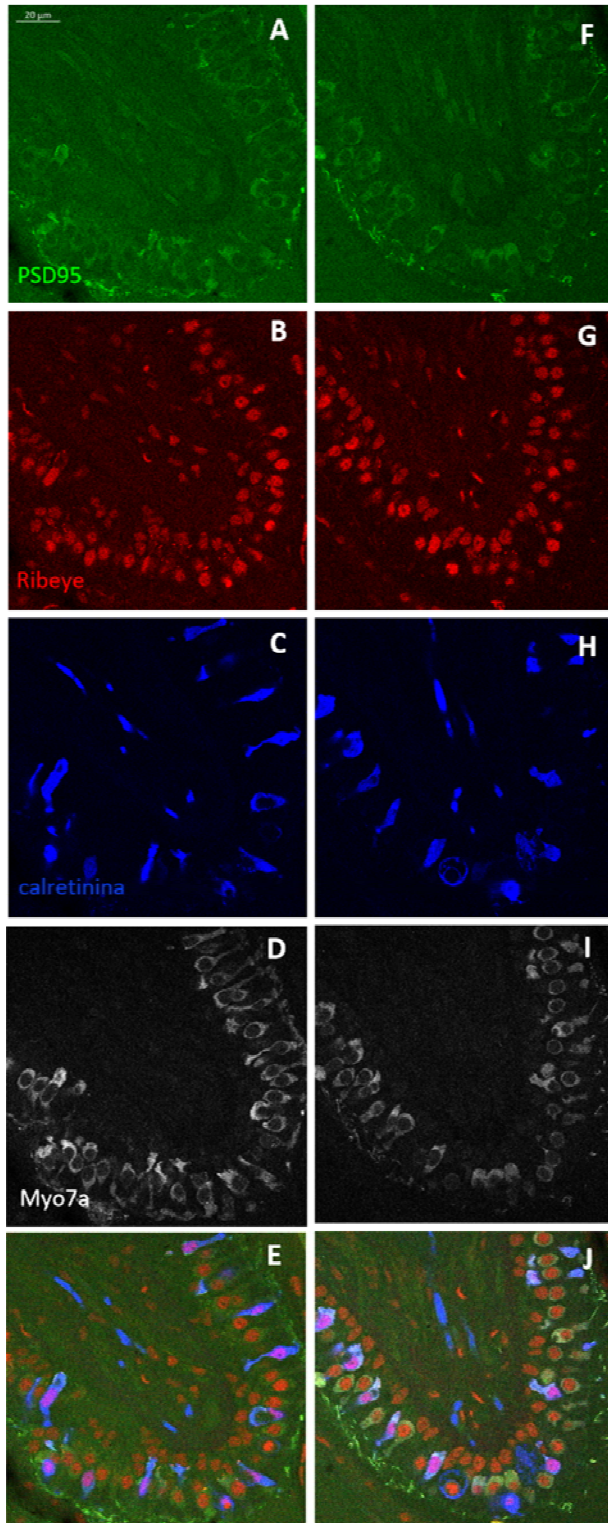


Figura R45. Efecto de la estreptomicina en las uniones sinápticas. En las imágenes aparecen PSD95 como proteína postsináptica (verde: A, F), Ribeye como proteína presináptica (rojo: B, G), calretinina (azul: C, H) y Myo7a (blanco: D, I). En la última fila (E y J) se encuentra la combinación de los cuatro canales. A-E: Cresta individuo control. B-J: Cresta de un animal expuesto a estreptomicina diariamente a una dosis de 500mg/kg durante 6 semanas.

La Figura R46 muestra el recuento medio de los puntos pre y post sinápticos por célula en secciones de tres micrómetros de cresta analizados. Se cuantificó de forma independiente Ribeye, PSD95, y las colocalizaciones entre ambas, signo de una sinapsis efectiva. No se realizó ninguna distinción entre las HCI y las HCII durante el análisis.

Los resultados indicaron que tras el tratamiento existe un descenso significativo en el número de ambas proteínas, y también en sus colocalizaciones, signo de un desacoplamiento sináptico. La reducción fue leve pero significativa con disminuciones respecto al control del 30.8%, 26.8% y 27.9% en Ribeye, PSD95 y colocalizaciones respectivamente.

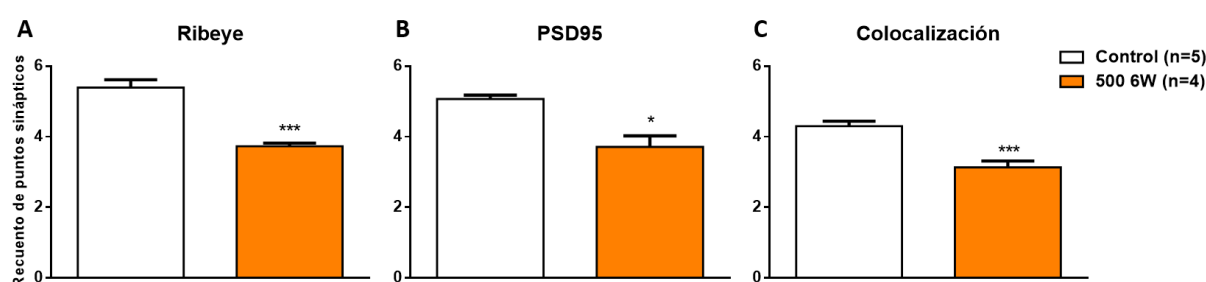


Figura R46. Efecto del tratamiento con estreptomicina en el número de densidades presinápticas (A, Ribeye), postsinápticas (B, PSD95) y colocalizaciones (C). Se compararon el grupo control y el grupo al que se administró estreptomicina a una dosis de 500mg/kg durante 6 semanas. Se incluyeron en el análisis machos y hembras y se analizaron un mínimo de 30 células por animal (HCI y HCII). Los gráficos de barras muestran los recuentos medios de puntos sinápticos ($X \pm SE$) cada 2.6 μ m. El grosor de cada imagen fue de 0.13 μ m en un stack total de 25 μ m. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control en la prueba de T-Student (PSD95 $p = 0.018$, Ribeye: $p = 0.000$ y colocalización: $p = 0.001$). Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados diariamente con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas.

CAPÍTULO IIB MODELO DE ESTREPTOMICINA DE DOS INYECCIONES DIARIAS

2b.1 Efecto de dos administraciones diarias de estreptomicina en el peso corporal

En el modelo de intoxicación crónica por IDPN (Sedó-Cabezón et al., 2015), los procesos de desensamblado de la unión calicial y desacoplamiento sináptico van seguidos de la eliminación de las células ciliadas por extrusión.

Los experimentos anteriores con una inyección diaria prueban que la ototoxicidad crónica por estreptomicina comparte también ambos de los procesos iniciales de la degeneración. Por otro lado, como se vio en los resultados anteriores, existe una pérdida significativa de células ciliadas de tipo I (HCI), pero sin evidencias ni de extrusión ni de cuerpos apoptóticos. En base a esto, resulta incierta la forma en la que las células ciliadas son eliminadas del tejido.

Con el objetivo de estudiar este proceso más en detalle, se planteó un nuevo modelo de dos

administraciones al día para repartir la dosis diaria de estreptomina. Con ello, se pretendió esquivar el efecto sedante potencialmente letal de las dosis elevadas, y a su vez, tener un efecto más sostenido en el tiempo, lo cual hipotetizamos que podría propiciar el proceso de extrusión.

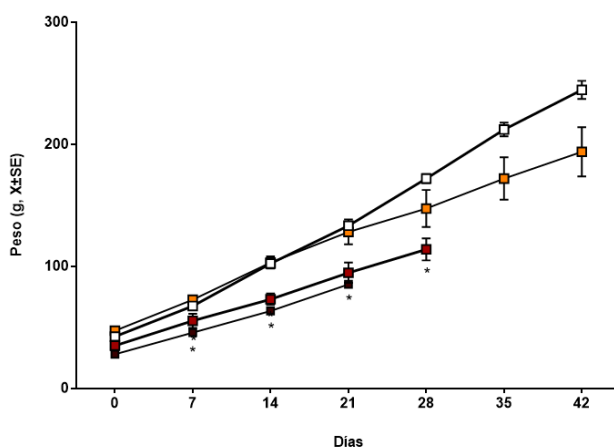
Las dosis se estimaron en base a los resultados del modelo anterior en los cuales hubo una pérdida funcional efectiva, 500 mg/kg. Al igual que en los experimentos precedentes, se utilizaron ratas Long Evans machos y hembras y éstas fueron divididas en cuatro grupos experimentales: control, 300, 350 y 400 mg/kg. Los tiempos de tratamiento fueron: tres semanas para el grupo de 400mg/kg, cuatro para el de 350mg/kg y seis para el grupo de 300mg/kg. Se utilizaron un total de 32 animales, 16 machos y 16 hembras con una distribución equitativa en ambos sexos en cada uno de los grupos.

El tratamiento de dos inyecciones al día fue más agresivo para las ratas que el de una, ya que tuvo un mayor impacto sobre el peso corporal y provocó una más temprana disfunción vestibular. Sin embargo, a corto plazo, las ratas toleraron mejor cada una de las dosis, sin mostrar signos de letargia después de la administración, y ninguna de ellas falleció.

La Figura R47 muestra, al igual que en el modelo anterior, que el efecto del tratamiento sobre el peso corporal fue mayor en machos que en hembras. Hubo una reducción del peso de éstos para la cuarta semana del 50 y 33% para los grupos de 350 y 400mg/kg, respectivamente en relación con el control. El grupo de 300mg/kg, se fue diferenciando del grupo control a medida que pasaron las semanas de tratamiento, con una reducción del peso del 20% respecto a los controles para la semana 42. Por otro lado, en hembras, las ratas control partieron con un peso menor a las que se utilizaron para los distintos grupos de tratamiento. Con la exposición a la estreptomina, las tratadas se mantuvieron en unos niveles ligeramente inferiores a los controles. Aun así, las diferencias de peso fueron menores en comparación al grupo de los machos.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en ambos sexos con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en machos y hembras en la media del peso corporal a lo largo del tiempo (F (1.157, 11.575): 561.815, p = 0.000 y F (1.262, 13.879): 605.385, p = 0.000, respectivamente), a causa del tratamiento (F (3,10): 15.045, p = 0.000 y F (3, 11): 7.804, p = 0.005, respectivamente) y en la interacción entre tiempo y tratamiento únicamente en machos (F (3.472, 11.575): 8.462, p = 0.002 y F (3.785, 13.879): 3.084, p = 0.054, respectivamente).

A Peso corporal en machos tras dos administraciones al día



B Peso corporal en hembras tras dos administraciones al día

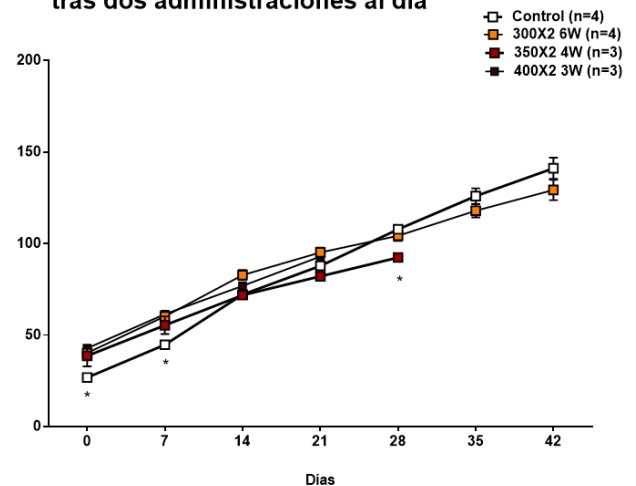


Figura R47. Efectos en el peso corporal de la administración crónica de estreptomicina subcutánea dos veces al día durante distintos intervalos de tiempo y dosis. Control, 300mg/kg durante 6 semanas (300X2 6W), 350mg/kg durante 4 semanas (350X2 4W) y 400mg/kg durante 3 semanas (400X2 3W). La gráfica muestra la media de peso ($X \pm SE$) de machos (A) y hembras (B) por separado. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control del mismo sexo, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

2b.2 Efecto de dos administraciones diarias de estreptomicina en la función vestibular

En cuanto a la función vestibular, evaluada mediante el ángulo mínimo (Figura R48), todos los grupos tratamiento presentaron una pérdida funcional al cabo de las dos semanas de exposición. Ésta fue ligera en el caso de 300mg/kg y severa en los otros dos grupos, llegando a ángulos de 60 grados en los animales de 400mg/kg.

A partir de la tercera semana, el grupo de 300mg/kg presentó una marcada disfunción vestibular similar al de los otros dos grupos con dosis más altas. De nuevo, no hubo diferencias de comportamiento entre machos y hembras para ningún grupo experimental.

La condición de 300mg/kg mostró una progresión en la pérdida funcional muy similar al de las ratas expuestas a IDPN 20mM en agua de bebida. En este último, las ratas mostraban signos de extrusión a partir de la sexta semana de tratamiento (Sedó-Cabezón et al, 2015). Por ello, y con el objetivo de intentar replicar el curso temporal de la extrusión, se mantuvieron las administraciones de estreptomicina durante ese mismo tiempo.

La prueba MANOVA de medidas repetidas en el conjunto de machos y hembras con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del ángulo mínimo a lo largo del tiempo ($F(2.534, 70.943): 245.824, p = 0.000$), a causa del tratamiento ($F(3, 28): 45.891, p = 0.000$) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(7.601, 70.943): 40.005, p = 0.000$).

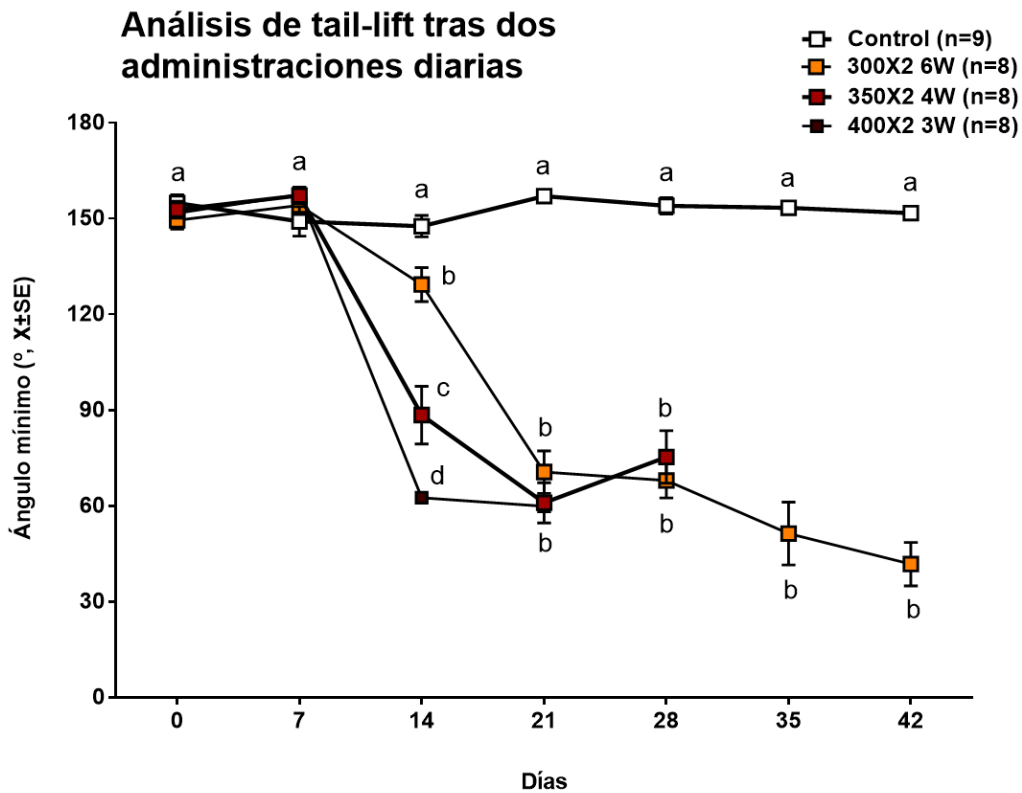


Figura R48. Efectos en el ángulo mínimo del reflejo tail-lift de la administración crónica de estreptomicina subcutánea dos veces al día. El tratamiento se mantuvo durante distintos intervalos de tiempo y se utilizaron diferentes concentraciones: control, 300mg/kg durante 6 semanas (300X2 6W), 350mg/kg durante 4 semanas (350X2 4W) y 400mg/kg durante 3 semanas (400X2 3W). La gráfica muestra la media del ángulo mínimo del reflejo de tail-lift ($X \pm SE$) de machos y hembras. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

2b.3 Recuperación funcional de los grupos de 350 y 400mg/kg

Debido al número limitado de ratas disponibles en el experimento, se dejaron únicamente dos animales (un macho y una hembra) de los grupos de 350 y 400mg/kg en un periodo de recuperación de tres semanas tras tres semanas de tratamiento. Como se puede observar en la Figura R49, los cuatro animales exhibieron una recuperación vestibular prácticamente completa.

Análisis de tail-lift en animales recuperación tras dos administraciones diarias

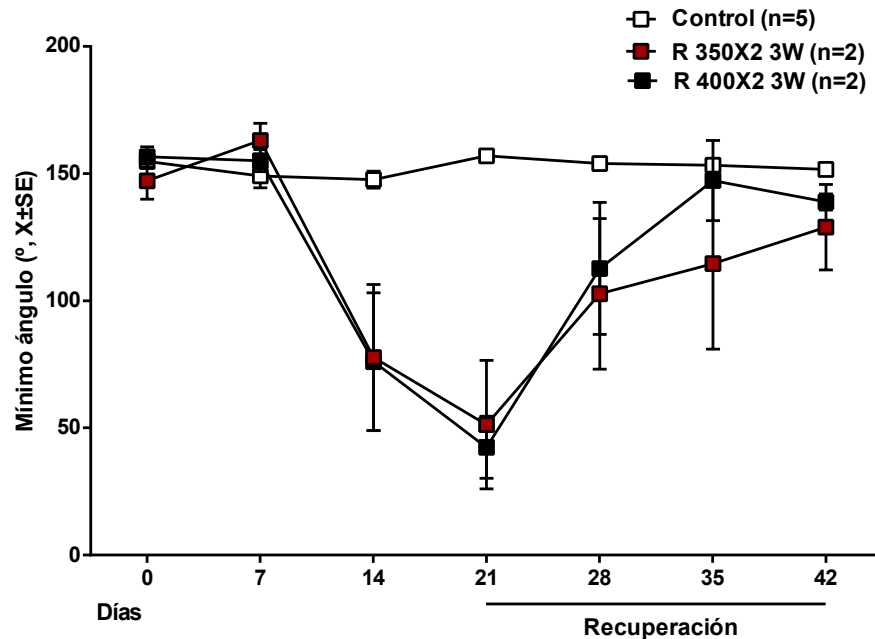


Figura R49. Recuperación del ángulo mínimo del reflejo tail-lift en ratas con una administración crónica de estreptomicina subcutánea dos veces al día a 350mg/kg (350X2 3W) y 400mg/kg (400X2 3W) durante 3 semanas con un periodo de recuperación de 3 semanas. Se presentan los resultados de cinco controles (tratados con PBS) y dos animales por cada grupo de tratamiento. La gráfica refleja los valores medios de ángulo mínimo en el reflejo de tail-lift ($X \pm SE$) en machos y hembras. El tiempo de recuperación se puede apreciar en la parte inferior de la gráfica representado con una línea.

2b.4 Efecto de las dos dosis diarias sobre el número de células ciliadas

Con el objetivo de estudiar el impacto de las dos administraciones sobre el número de células ciliadas, se procesaron crestas, utrículos y sáculos de animales control, tratados y recuperación por inmunohistoquímica para un posterior recuento de células. Los marcajes utilizados fueron Spp1 para la identificación de las células ciliadas de tipo I y calretinina para las células ciliadas de tipo II.

La Figura R50 muestra el recuento de HCI y HCII en crestas. Se puede observar que alrededor del 70% de HCI se perdieron en todos los grupos de tratamiento en comparación con los controles. Los números de HCII, en cambio, se mantuvieron estables, del mismo modo que en el modelo de una administración diaria.

La pérdida de células ciliadas en general (HCs) a causa del tratamiento fue del 55% aproximadamente (estimada a partir de la suma de HCI y HCII). Por último, las ratas recuperación registraron unos recuentos de células ciliadas de tipo I y II similares a las tratadas.

HCI y HCII en cresta

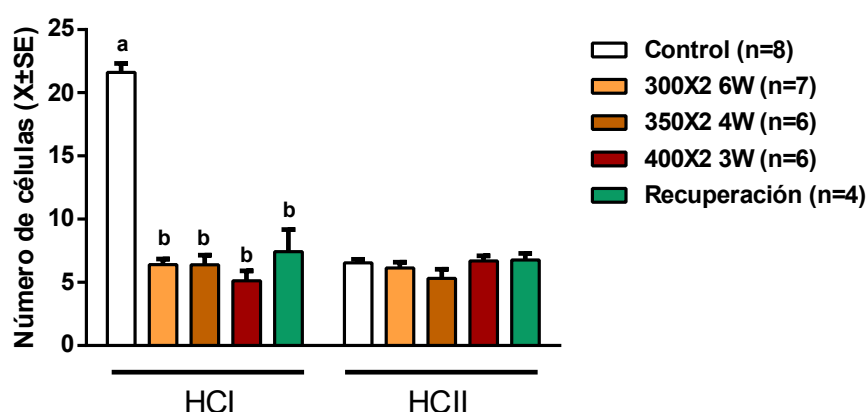


Figura R50. Efecto de la exposición a estreptomicina dos veces al día sobre el número de células ciliadas de tipo I (HCI) y II (HCII). Datos mostrados en función del tratamiento: control (C), 300mg/kg dos veces al día durante 6 semanas (300X2 6W), 350mg/kg dos veces al día durante 4 semanas (350X2 4W), 400mg/kg dos veces al día durante 3 semanas (400X2 3W) y recuperación. Los datos mostrados corresponden a crestas y se incluyeron en el análisis machos y hembras. Los marcajes utilizados para el recuento fueron Spp1 para identificar las células ciliadas de tipo I y calretinina para las células ciliadas de tipo II. Los gráficos de barras muestran los recuentos de HCI y HCII ($X \pm SE$) en crestas según el tratamiento. El grosor de cada imagen fue de $0.5 \mu\text{m}$ en un stack total de $25\mu\text{m}$. Los recuentos de células corresponden al número medio de células en una imagen de un grosor de $3 \mu\text{m}$ de epitelio sensorial. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. HCI: $F(3,27): 105.878 p = 0.000$. En el grupo de recuperación se incluyeron animales tratados con estreptomicina a una dosis de 350mg/kg o 400mg/kg durante 3 semanas con un periodo de recuperación de 3 semanas.

Los utrículos y sáculos se marcaron por inmunohistoquímica con la combinación de anticuerpos Myo7a y Caspr1, el cual no permitió la diferenciación entre HCI y HCII. En consecuencia, únicamente se analizaron el número total de células ciliadas y aquellas HCI positivas para Caspr1. El análisis por lo tanto no contempló las células ciliadas de tipo I que dejaron de expresar Caspr1 a causa del tratamiento.

Los resultados se pueden observar en la Figura R51, los cuales muestran en utrículo una pérdida media de alrededor del 46% en el número total de células para los grupos tratamiento. En el sáculo, en cambio, la pérdida media fue menor, de alrededor del 25% entre los tres grupos tratados, sugiriendo una mayor resistencia al tratamiento. No obstante, debido al bajo número de controles analizados en utrículo y sáculo, no es prudente establecer conclusiones al respecto.

Por otro lado, en las ratas recuperación, los utrículos mostraron pérdidas del total células ciliadas totales similares a los grupos tratamiento. En los sáculos, en cambio, la pérdida de células fue ligeramente menor, del 12% en comparación al 25% de los grupos tratamiento.

Respecto al recuento de células positivas por Caspr1 (Figura R51B), se aprecia una reducción considerable de estas en utrículo y sáculo (de alrededor del 90 y 78 por ciento respectivamente como media de los tres grupos tratamiento). En las ratas recuperación, en cambio, las diferencias respecto a los controles fueron ligeramente menores, registrando una disminución de alrededor del 56 y 55% en utrículo y sáculo respectivamente. No obstante, estos números no son representativos del número total de HCI ya que no se tuvo en cuenta aquellas que perdieron la Caspr1 en su totalidad a causa de la ototoxicidad.

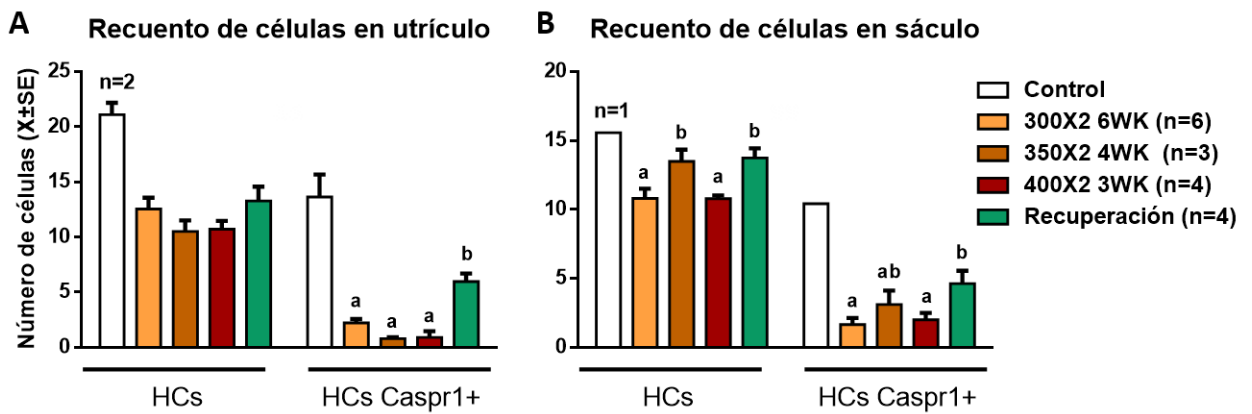


Figura R51. Efecto de la exposición a estreptomicina dos veces al día en la pérdida del número total de células ciliadas y HCl positivas para Caspr1. Datos mostrados en función del tratamiento: control, 300mg/kg dos veces al día durante 6 semanas (300X2 6W), 350mg/kg dos veces al día durante 4 semanas (350X2 4W), 400mg/kg dos veces al día durante 3 semanas (400X2 3W) y recuperación, ver leyenda. Para el análisis se tuvieron en cuenta machos y hembras. Los gráficos de barras muestran los recuentos del total de células ciliadas y Caspr1+ ($X \pm SE$) según el epitelio vestibular y el tratamiento. El grosor de cada imagen fue de $0.5 \mu\text{m}$ en un stack total de $25\mu\text{m}$. Los recuentos de células corresponden al número medio de células por cada $3 \mu\text{m}$ de epitelio sensorial. No se pudo realizar un análisis estadístico teniendo en cuenta los controles por el bajo número de animales en el grupo (dos en el caso de utrículo y uno en sáculo). En consecuencia, se realizó un análisis teniendo en cuenta únicamente los grupos tratamiento y recuperación. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. HCs Caspr1+ Utrículo: $F(3,13): 20.881 p = 0.000$. HCs Sáculo: $F(3,12): 5.681 p = 0.010$. HCs Caspr1+ Sáculo: $F(3,13): 3.855 p = 0.036$. En el grupo de recuperación se incluyeron animales tratados con estreptomicina a una dosis de 350mg/kg o 400mg/kg durante tres semanas con un periodo de recuperación de tres semanas.

2b.5 Análisis de Caspr1, Spp1 y calretinina en el modelo de dos inyecciones diarias

De la misma forma que en el modelo de IDPN y de una inyección diaria de estreptomicina, se quiso estudiar la desaparición de Caspr1 en este segundo modelo de estreptomicina, donde la afectación vestibular fue mayor y más temprana.

Para ello se, se utilizaron las imágenes de microscopía confocal de crestas en las que se realizó el recuento celular (con los marcajes de Caspr1, Spp1 y calretinina).

Por otra parte, Spp1 ha sido identificada recientemente como marcador específico de las células ciliadas de tipo I (McInturff et al., 2018) y, como se verá más adelante, fue escogida como proteína de interés de estudio a partir de los datos de RNA-seq obtenidos con anterioridad al presente experimento. El tratamiento también provocó una marcada reducción de esta proteína, con su ausencia total o única conservación en la parte apical de algunas células.

La Figura R52 muestra la desaparición casi por completo del marcaje de Caspr1 y una reducción de Spp1 para los tres grupos de animales tratados: 300mg/kg seis semanas, 350mg/kg cuatro semanas y 400mg/kg tres semanas.

Sorprendentemente, y al contrario que en los modelos anteriores, en las ratas recuperación se observaron unos niveles de fluorescencia de Caspr1 y Spp1 similares a los grupos de tratamiento.

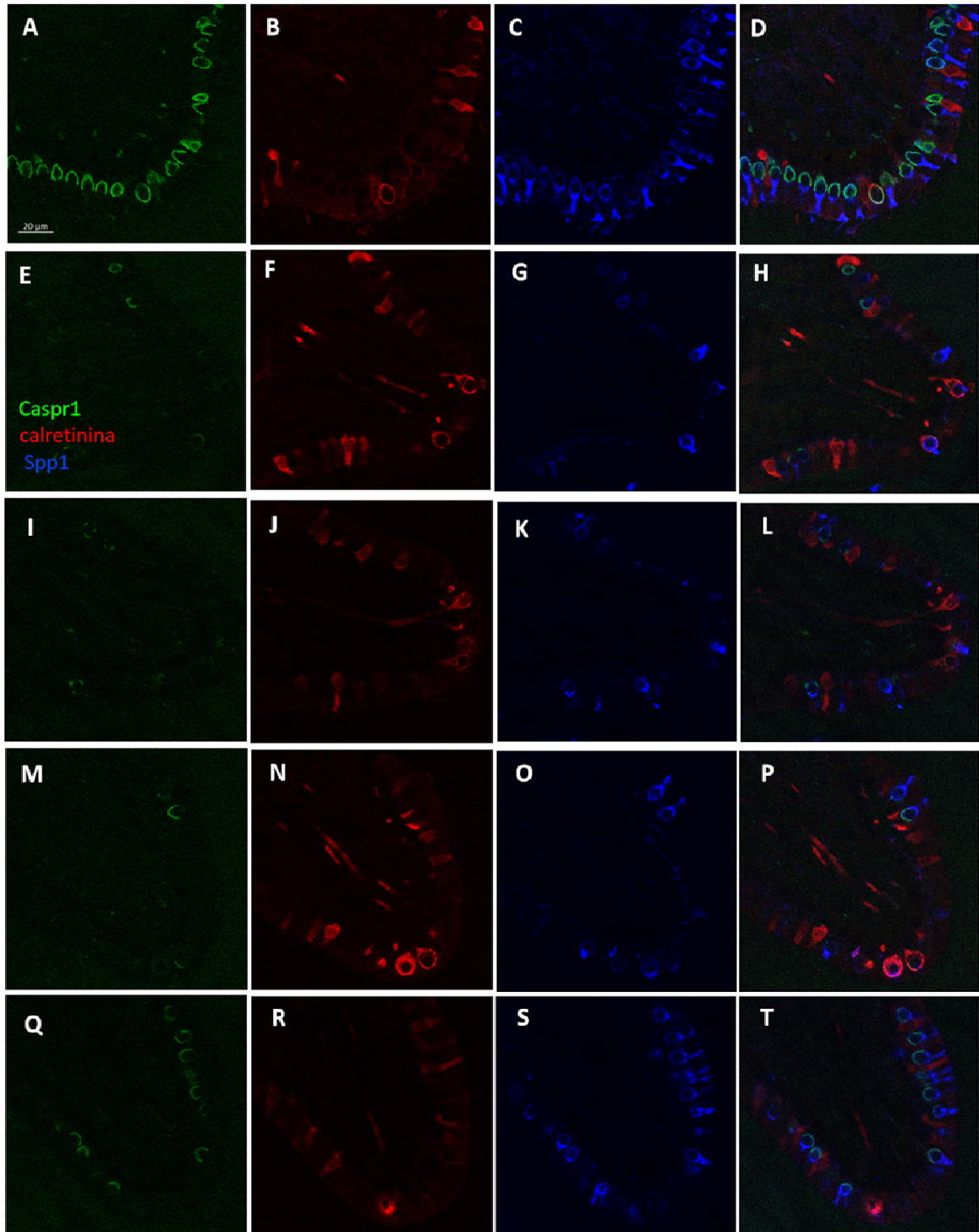


Figura R52. Efecto de la administración de estreptomina dos veces al día en las proteínas Caspr1 y Spp1 en crestas. En las imágenes aparecen Caspr1 (verde: A, E, I, M y Q), calretinina (rojo: B, F, J, N y R) y Spp1 (azul: C, G, K, O y S). En la columna de la derecha aparecen conjuntamente los tres marcajes (D, H, L, P y T). Las imágenes corresponden a crestas de animales con distintos tratamientos: A-D. Animal tratado con PBS dos veces al día, E-H. Animal expuesto a estreptomina dos veces al día durante 6 semanas en dosis de 300mg/kg, I-L. Animal expuesto a estreptomina dos veces al día durante 4 semanas a dosis de 350mg/kg, M-P. Animal expuesto a estreptomina dos veces al día durante 3 semanas a dosis de 400mg/kg y Q-T. Animal tratado con estreptomina a una dosis de 400mg/kg durante tres semanas con un periodo de recuperación de tres semanas.

La Figura R53 presenta el análisis cuantitativo de la Caspr1 en crestas, donde la reducción media de fluorescencia entre los animales tratados fue del 65% respecto a los controles, ligeramente mayor al 60% observado en el modelo de una administración diaria. Todos los grupos tratados

revelaron unos niveles de Caspr1 similares y significativamente más bajos al control. A diferencia del modelo de una inyección diaria, los animales recuperación mostraron niveles de Caspr1 similares a los tratados, signo de una ausente recuperación en la expresión de la proteína.

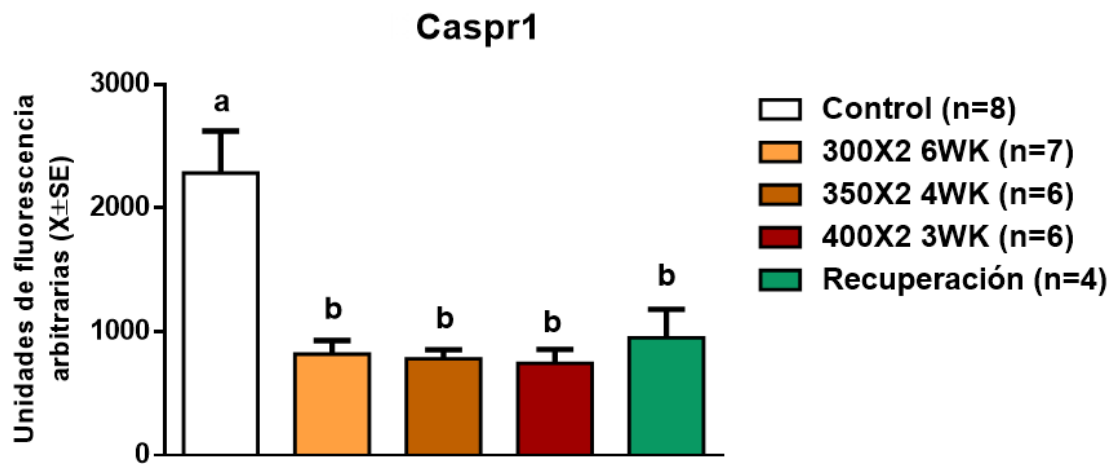


Figura R53. Efecto de la administración subcutánea de estreptomicina dos veces al día en la Caspr1. Los tratamientos fueron los siguientes: control, 300mg/kg (300X2 6W), 350mg/kg (350X2 4W), 400mg/kg (400X2 3W) dos veces al día y recuperación. Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células por animal en cresta. El grosor de cada imagen fue de 0.5 μm en un stack total de 25 μm . Las letras encima del gráfico de barras indican qué muestras son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Caspr1: F (4,25): 47.270 $p = 0.000$. En el grupo de recuperación se incluyeron animales tratados con estreptomicina a una dosis de 350mg/kg o 400mg/kg durante tres semanas con un periodo de recuperación de tres semanas.

En base a estos resultados, se quiso estudiar con mayor detalle la divergencia existente entre los registros funcionales de los animales recuperación y sus datos de Caspr1. Para ello se hizo un recuento, sin importar la intensidad de la fluorescencia, del número de HCl que conservaban el cáliz sin signos de fragmentación (Figura R54). Se observó entonces, que el porcentaje de cálices completos en las ratas recuperación era mucho mayor que en las que no habían tenido la interrupción en el tratamiento.

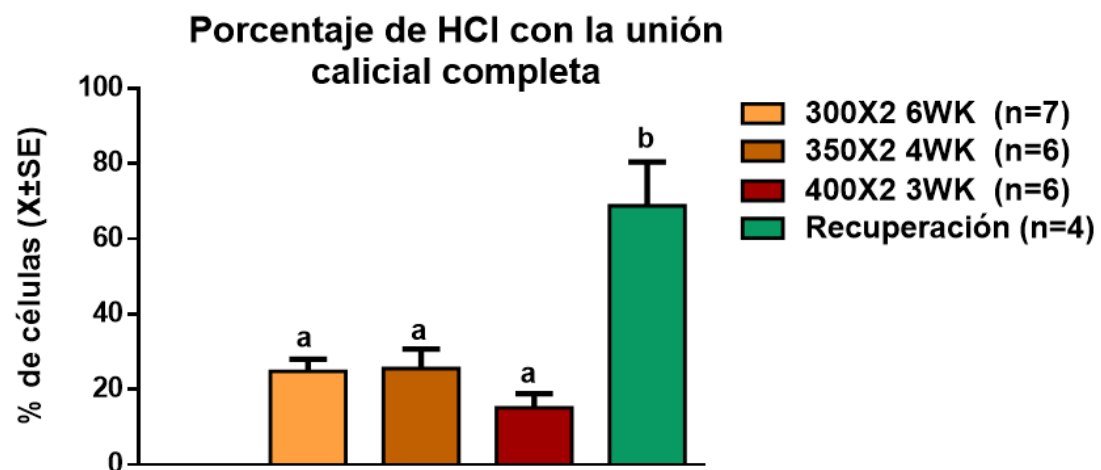


Figura R54. Porcentaje de células ciliadas de tipo I con la unión calicial no fragmentada después de la administración subcutánea de estreptomicina. Los tratamientos fueron los siguientes: 300mg/kg (300X2 6W), 350mg/kg (350X2 4W), 400mg/kg (400X2 3W) dos veces al día y recuperación. Los recuentos corresponden al número total de HCl con el cáliz completo en un stack de un grosor total de 25 μm en cresta. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. F (3, 19): 14.854, $p = 0.000$. En el grupo de recuperación se incluyeron animales tratados con estreptomicina a una dosis de 350mg/kg o 400mg/kg durante tres semanas con un periodo de recuperación de tres semanas.

También se estudió la Caspr1 en utrículos y sáculos, y la pérdida media entre los grupos tratamiento y los controles fue de alrededor del 76 y 62% en utrículos y sáculos respectivamente (Figura R55). No obstante, debido al escaso número de muestras disponibles, únicamente se analizaron dos utrículos y un sáculo control, por lo que los resultados obtenidos no son concluyentes.

A diferencia de las crestas, en este caso, en las ratas recuperación sí que se encontraron unos niveles de Caspr1 significativamente mayores a las tratadas, mostrando indicios de una leve recuperación en la proteína.

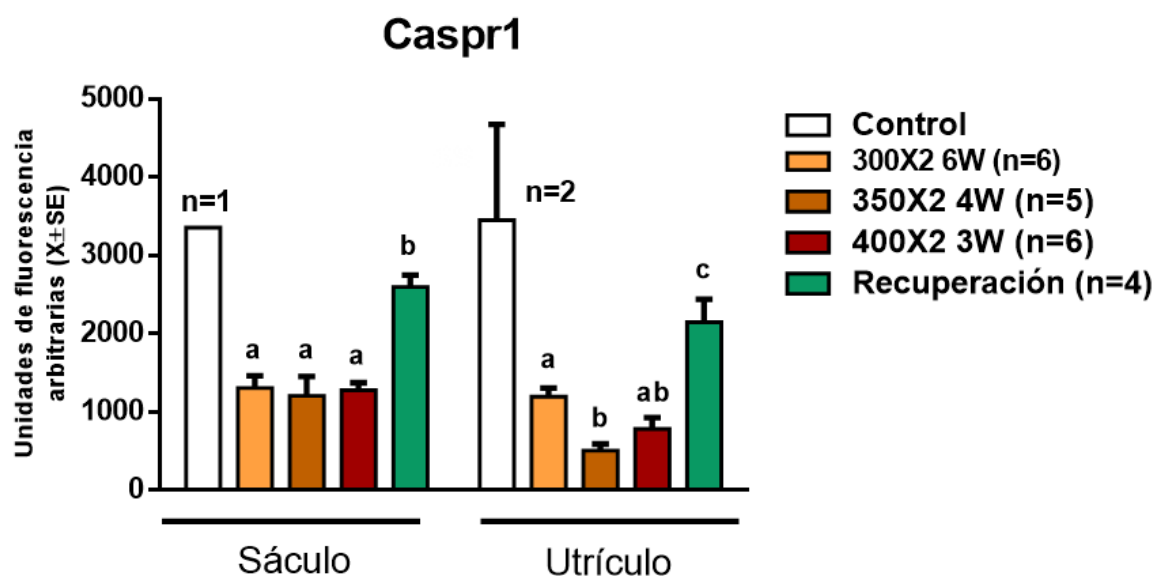


Figura R55. Efecto de la administración subcutánea de estreptomicina dos veces al día en la proteína Caspr1 en utrículo y sáculo. Los tratamientos fueron los siguientes: control, 300mg/kg (300X2 6W), 350mg/kg (350X2 4W) y 400mg/kg (400X2 3W) dos veces al día y recuperación. Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células en inmunofluorescencia. El grosor de cada imagen fue de 0.5 μ m en un stack total de 25 μ m. No se pudo hacer un análisis estadístico teniendo en cuenta los controles por el bajo número de animales analizados (dos en el caso de utrículo y uno en sáculo). En consecuencia, se realizó un análisis considerando únicamente los grupos tratamiento y recuperación. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Caspr1 Sáculo: F (3,13): 15.738 p = 0.000. Caspr1 Utrículo: F (3,13): 14.688 p = 0.000. En el grupo de recuperación se incluyeron animales tratados con estreptomicina a una dosis de 350mg/kg o 400mg/kg durante tres semanas con un periodo de recuperación de tres semanas.

Por otra parte, la Figura R56 presenta la cuantificación de la fluorescencia de calretinina y Spp1 en crestas. La fluorescencia de ambas proteínas se vio ligeramente disminuida en los grupos tratamiento. Los niveles para el grupo de 400mg/kg fueron significativamente mayores en ambas proteínas respecto a los otros dos grupos tratamiento, pero, aun así, se mantuvieron muy por debajo de los niveles del control. Las reducciones en calretinina y Spp1 fueron de alrededor del 25 y 45% en el grupo de 300mg/kg respectivamente, 36 y 38% en el grupo de 350mg/kg respectivamente y, por último, 19 y 26% en el grupo de 400mg/kg respectivamente respecto a los controles.

Las ratas recuperación, al igual que en Caspr1, mostraron signos de un restablecimiento incompleto de la fluorescencia para ambas proteínas.

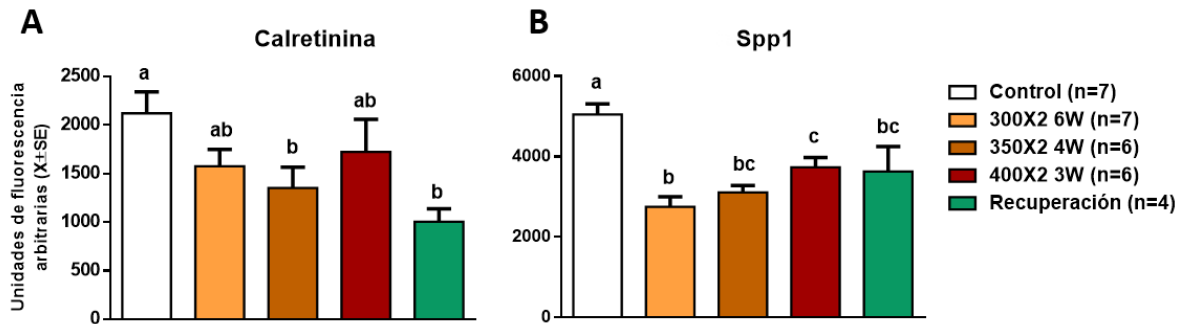


Figura R56. Efecto de la administración subcutánea de estreptomicina dos veces al día en calretinina y Spp1 en cresta. Los tratamientos fueron los siguientes: control, 300mg/kg (300X2 6W), 350mg/kg (350X2 4W), 400mg/kg (400X2 3W) dos veces al día y recuperación. Se cuantificó la fluorescencia total media en cresta de 30 células en inmunofluorescencia. El grosor de cada imagen fue de 0.5 μ m en un stack total de 25 μ m. Las letras encima del gráfico de barras indican qué grupos son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. Calretinina: F (4,25): 2.877 p = 0.043, Spp1: F (4,25): 10.264 p = 0.000. En el grupo de recuperación se incluyeron animales tratados con estreptomicina a una dosis de 350mg/kg o 400mg/kg durante tres semanas con un periodo de recuperación de tres semanas.

2b.6 Estudio de la extrusión por microscopía confocal

Como primera aproximación al estudio de la extrusión en el modelo de dos administraciones diarias, se procesaron la cresta, el utrículo y el sáculo de estos animales por inmunohistoquímica. Los marcadores utilizados fueron los siguientes: Caspr1 para identificar las uniones caliciales, Myo7a para las células ciliadas y Radixin (RDX) como marcaje de los estereocilios y las microvellosidades de la superficie apical del epitelio vestibular, para delimitar los límites tisulares.

En crestas, a pesar de haber registrado una gran pérdida de células ciliadas, no se apreciaron signos de extrusión en las imágenes de fluorescencia. Por el contrario, en utrículos de ratas tratadas con las dosis de 300 y 350mg/kg fue relativamente frecuente encontrar algunas células en proceso de extrusión y o extruidas totalmente (aproximadamente 1-3 por cada sección de 25 μ m). En sáculos, al igual que en crestas, no se encontraron células extruidas.

Las imágenes obtenidas permiten la reconstrucción del proceso de la progresiva movilización de las células ciliadas desde el epitelio hasta la cavidad endolinfática (Figura R57).

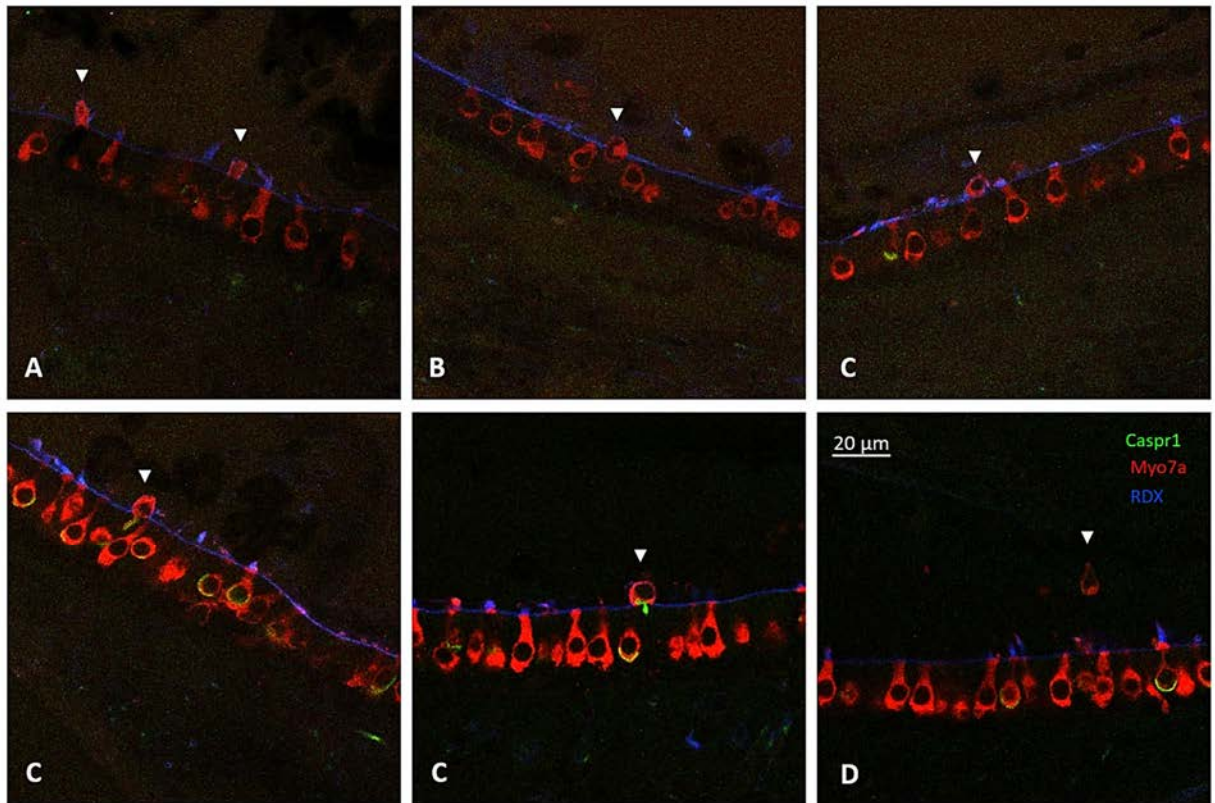


Figura R57. Progresión de la extrusión en ratas expuestas a estreptomicina dos veces al día (A-D). En las imágenes se muestran epitelios sensoriales de utrículos de ratas tratadas dos veces al día durante 4 semanas a una dosis de 350mg/kg o 6 semanas a 300mg/kg. El marcaje en verde corresponde a Caspr1, el rojo a Myo7a y el azul a Radixina (RDX). Se ha señalado con una flecha blanca las células extruidas o en proceso de extrusión. La secuencia de extrusión sugerida se ha ordenado de la A (inicio) a D (final), en la cual aparece una célula ciliada completamente fuera del epitelio sensorial.

2b.7 Estudio de la extrusión por ultraestructura

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) revelaron, al igual que en microscopía confocal, algunas células en proceso de extrusión (Figura R58). Además, no se observaron signos de apoptosis o daño en las células presentes en el tejido.

Las imágenes también señalaron, en concordancia con los análisis de fluorescencia de Caspr1, una mayor pérdida de electrodensidad en las uniones caliciales de las células ciliadas de tipo I y la neurona respecto al modelo de una inyección diaria (Figura R58D-E).

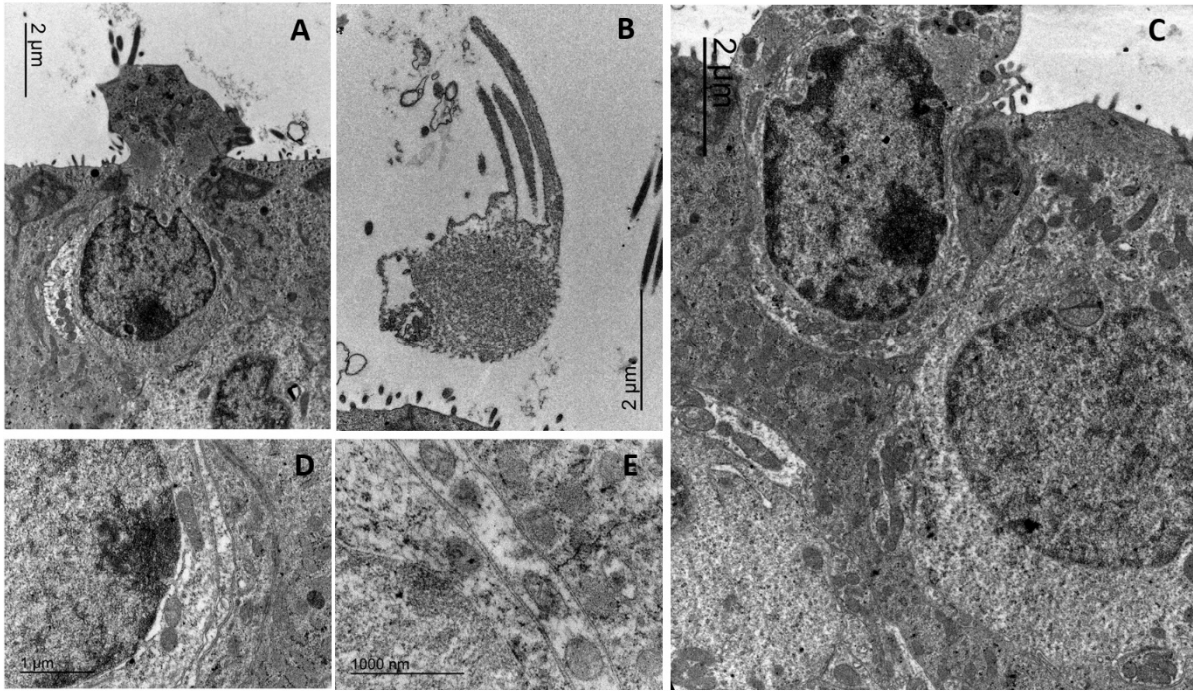


Figura R58. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de ratas tratadas durante 6 semanas con estreptomicina dos veces al día a una dosis de 300mg/kg. A: Célula ciliada de tipo I con protrusiones hacia el exterior de la membrana apical y a su vez con claros signos de fragmentación en su unión calicial. B: Célula ciliada totalmente extruida. C: Célula ciliada en extrusión con parte del núcleo en la cavidad endolinfática. D y E: Imágenes que muestran la pérdida de electrodensidad en la región calicial.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) constataron la gran pérdida de células en los animales tratados. Asimismo, al igual que en los casos anteriores, también fue posible encontrar algunas células totalmente extruidas (Figura R59).

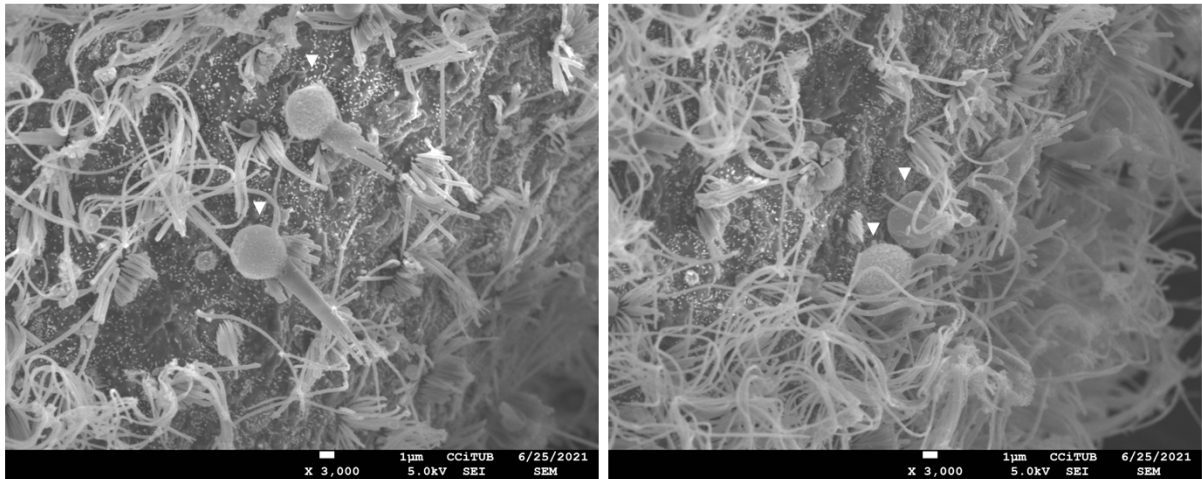


Figura R59. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una rata tratada durante 6 semanas con estreptomicina dos veces al día a una dosis de 300mg/kg. Se pueden observar células en extrusión señaladas en la imagen con una flecha blanca.

CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LAS UNIONES CALICIALES EN MUESTRAS DE PACIENTES CON SCHWANNOMA VESTIBULAR

3.1 Fragmentación calicial en pacientes con schwannoma vestibular

El schwannoma vestibular es un tumor que se desarrolla sobre el nervio vestibular a partir de células de Schwann. A pesar de su carácter benigno, su localización lo convierte en potencialmente letal, y adicionalmente, causa pérdidas de función auditiva y vestibular. Estudios recientes han demostrado que en este tipo de tumores se secretan factores inflamatorios que dañan tanto el epitelio vestibular como el coclear (Dilwali et al., 2015). Este fenómeno supone una forma de toxicidad muy diferente a las descritas anteriormente con IDPN o estreptomycin.

El laboratorio donde se realizó la tesis colabora con un equipo de cirujanos del servicio de otorrinolaringología del Hospital Germans Trias i Pujol. Éstos realizan extirpaciones de este tipo de tumores con finalidad terapéutica mediante un abordaje quirúrgico a través del oído interno. Este procedimiento posibilita la recogida de epitelios vestibulares de los pacientes. En esta tesis se tuvo la oportunidad de obtener muestras de este tipo para poder estudiar la fragmentación de los cálices en muestras humanas.

Para ello, se siguió el mismo protocolo de procesamiento por inmunohistoquímica que en las muestras de rata, con la dificultad añadida de las diferencias anatómicas existentes entre ambos organismos.

Se utilizaron tres anticuerpos en la tinción por inmunohistoquímica: Myo7a para marcar las células ciliadas, Caspr1 para identificar las uniones caliciales y calretinina para diferenciar las células ciliadas de tipo II y las terminales axonales de tipo cáliz únicamente. Los epitelios se montaron enteros sobre un portaobjetos, pero el grosor de éstos dificultó la obtención de fotos nítidas por microscopía confocal.

En cuatro muestras (de un total de 12 procesadas) de pacientes con disfunción vestibular se encontraron células ciliadas con signos de fragmentación en los cálices. La Figura R60 presenta imágenes donde se puede observar este fenómeno de fragmentación y desaparición de la Caspr1 en algunas células (marcadas con una flecha).

Las Figura R60I y R60J representan la reconstrucción 3D de un cáliz intacto y otro en fragmentación, respectivamente, correspondientes a un mismo paciente con afectación vestibular. Es importante señalar que la pérdida de Caspr1 también se manifiesta por zonas, tal y como se había estudiado en los modelos en rata.

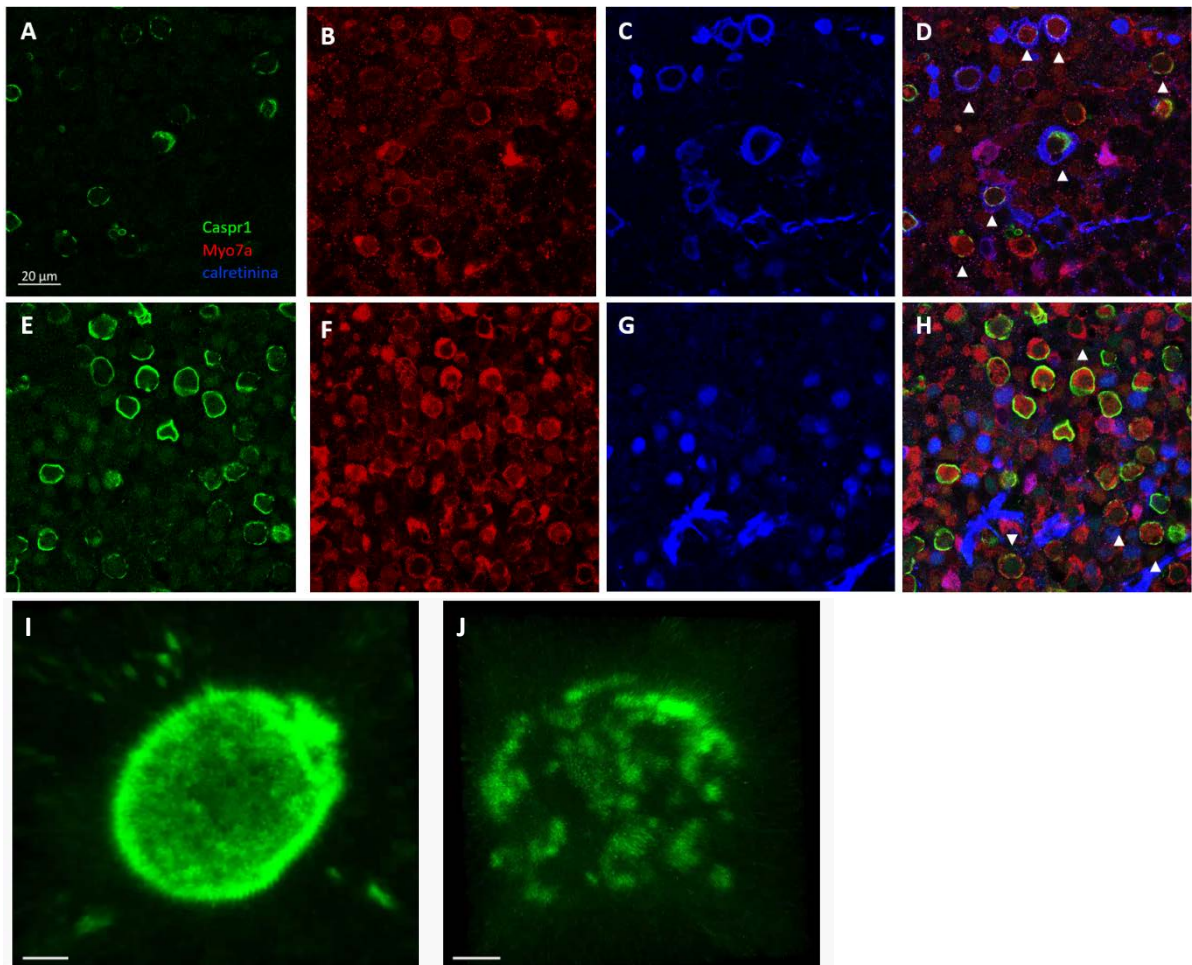


Figura R60. Efecto del schwannoma vestibular en la distribución de la proteína Caspr1 en los cálices aferentes a células ciliadas de tipo I humanas. Las imágenes muestran el epitelio sensorial vestibular correspondiente un paciente con una disfunción vestibular diagnosticada mediante el video impulso cefálico (VHIT). En las imágenes aparecen Caspr1 (verde: A, E, I y J), Myo7a (rojo: B y F) y calretinina (azul: C y G). En la columna de la derecha aparecen conjuntamente los tres marcajes (D y H). Las células con pérdida y fragmentación de los cálices están resaltadas con una flecha. Las dos últimas fotografías presentan la reconstrucción 3D de dos cálices de un mismo paciente, uno completo (I) y otro fragmentado (J).

CAPÍTULO IV: ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE LOS MODELOS DE IDPN Y ESTREPTOMICINA EN EPITELIO

4.1 Objetivo principal

En el laboratorio donde se realizó esta tesis se caracterizaron algunos de los procesos moleculares propios del modelo de exposición crónica a IDPN en rata y ratón (Lara-sedo et al., 2015; Greguske et al., 2019). Como se ha explicado anteriormente, se han encontrado diversas similitudes en los mecanismos de degeneración existentes entre los modelos de IDPN y el de una inyección diaria de estreptomina caracterizado en esta tesis. Por lo que, con el objetivo de descubrir más en profundidad las vías implicadas en estas respuestas, se realizó una aproximación transcriptómica mediante los análisis de RNA-seq en los tres modelos.

4.2 Estudio de RNA-seq en ratones expuestos a IDPN

En la tesis doctoral de Erin Greguske se realizó un estudio de RNA-seq en ratones macho expuestos durante 8 semanas a IDPN a una concentración de 30mM. La exposición provoca en los ratones una degeneración vestibular con muchas similitudes al del modelo de 4 semanas en rata. En este punto de la lesión, las células ciliadas se desconectan de la neurona, perdiendo gran parte de las proteínas de adhesión propias de la unión entre las células ciliadas de tipo I (HCI) y su aferente. Asimismo, es un punto donde todavía no hay extrusión y por tanto existe la posibilidad de una recuperación funcional completa si se interrumpe el tratamiento (Greguske et al., 2019).

El RNA-seq realizado comparó el transcriptoma del epitelio sensorial vestibular (seis crestas y dos utrículos) de tres animales control y tratados (con Vestibular Dysfunction Rating o VDRs de 7, 14, 14). Del total de 17219 secuencias de ARNm disponibles, hubo un total de 1134 genes diferencialmente expresados (6.58%) y con un p valor ajustado menor a 0.05. De entre ellos, en 439 (38.72%) hubo un incremento de expresión, mientras que en 695 (61.28%) hubo una reducción en comparación a los ratones control.

Para conocer más en detalle la implicación fisiológica de los cambios en el transcriptoma se realizó un análisis funcional con la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Ésta relaciona los genes afectados con diferentes vías o procesos moleculares implicados.

El análisis KEGG mostró la afectación de numerosos mecanismos moleculares a causa de la exposición ototóxica. Y de entre ellos, el grupo de "adhesión celular" resultó ser altamente significativo ($p = 2.21E-16$). En este grupo se encontraron un total de 51 genes diferencialmente expresados, 5 de los cuales estaban regulados positivamente, mientras que, en el resto, su expresión se encontraba disminuida. Además, la mayoría de los disminuidos codificaban para cadherinas o protocadherinas, glucoproteínas de adhesión célula-célula dependientes de calcio que participan en las conexiones sinápticas. Estos resultados reforzaron la hipótesis de que, a causa del tratamiento, se pierden las proteínas adhesión entre la célula ciliada de tipo I y su aferente, como se observaba en los estudios de TEM e inmunofluorescencia previamente comentados.

En el análisis funcional también aparecieron incrementados numerosos genes relacionados con la vía de señalización por interferón (*Stat1*, *Stat2*, *Irf9*, *Irf7*, *Irf1*, *Isg15*, *Ddx58*, *Usp18*, entre otros).

4.3 Preparación del estudio de RNA-seq en ratas expuestas a IDPN

Una vez obtenidos los resultados de RNA-seq en ratón, se realizó en esta tesis el mismo procedimiento con el modelo de IDPN en rata, previamente caracterizado (Sedó-Cabezón et al, 2015). El objetivo fue identificar mecanismos moleculares comunes en ambas especies relacionados con el inicio del daño crónico en el epitelio vestibular.

Para el estudio, se utilizaron un total 19 ratas macho Long Evans distribuidas en dos grupos: 12 tratadas con IDPN (20 mM en el agua de bebida) durante cuatro semanas y 7 controles. En concordancia con las investigaciones previas (Llorens y Rodríguez-Farré, 1997; Sedó-Cabezón et al., 2015), la exposición a IDPN produjo un freno en el incremento de peso corporal de las ratas tratadas, mostrando al final del experimento un peso de alrededor de 250 g, similar al inicial.

Las ratas control, en cambio, incrementaron su peso hasta una media de 340 g.

Las tratadas revelaron claros síntomas de disfunción vestibular, manifestados por la caída en el ángulo mínimo a partir de la tercera semana de exposición. La pérdida funcional fue incrementando progresivamente hasta la semana cuatro (Figura R61).

La prueba MANOVA de medidas repetidas con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del ángulo mínimo a lo largo del tiempo ($F(3.454, 37.989): 23.554, p = 0.000$), a causa del tratamiento ($F(1, 11): 36.575, p = 0.000$) y en la interacción entre tiempo y tratamiento ($F(3.454, 37.989): 21.695, p = 0.000$).

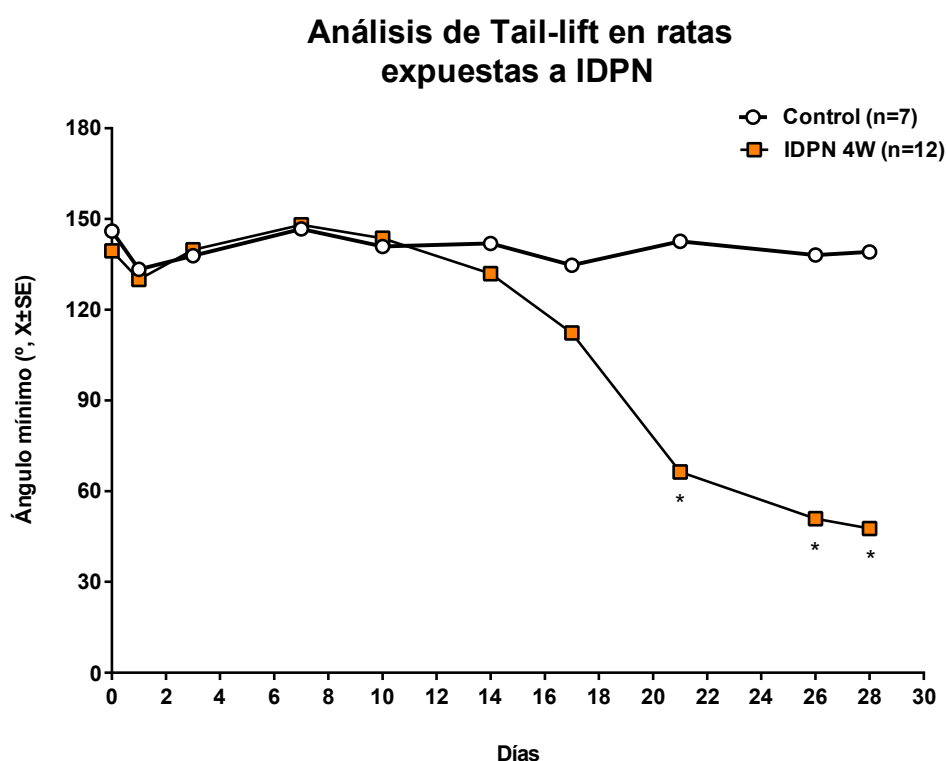


Figura R61. Efectos en el ángulo mínimo del reflejo tail-lift de la exposición crónica de IDPN a una concentración de 20mM durante 4 semanas en agua de bebida. La gráfica muestra la media del ángulo mínimo en machos ($X \pm SE$) según el tratamiento: control o IDPN 4W. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. IDPN 4W: ratas expuestas a IDPN 20mM en agua de bebida durante 4 semanas.

4.4 Efecto del IDPN en el transcriptoma del epitelio vestibular de rata

El estudio de RNA-seq comparó el transcriptoma del epitelio vestibular (6 crestas y 2 utrículos) de animales macho expuestos a IDPN a una concentración de 20mM en agua de bebida durante cuatro semanas respecto a controles. De los 19 animales del estudio, se seleccionaron 3 controles y 3 tratados. Los resultados de comportamiento mediante el análisis de ángulo mínimo de tail-lift fueron los siguientes: 45, 26 y 40 grados en tratados y 149, 150 y 150 en controles. De las 22250 secuencias de ARN mensajero codificantes para proteína, hubo 2862 (12.86%) diferencialmente expresadas y con un p valor ajustado menor a 0.05. De entre estos genes, en 1099 (38.39%) hubo un incremento de expresión y en 1763 (61.60%) un decremento en tratados

respecto a controles.

La Figura R62 representa el mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados con una mayor significación estadística. Se observa que en la mayoría de ellos (88%) existe una disminución en la expresión en tratados respecto a controles.

El análisis funcional, realizado a partir de la bases de datos KEGG, mostró numerosas vías moleculares que podrían estar afectadas a causa del tratamiento (con un p valor inferior a 0.05). El análisis funcional, al igual que en ratón, mostró que vías relacionadas con la adhesión célula-célula resultaron ser altamente significativas. De entre los genes diferencialmente expresados, se encontró una disminución de 26 genes codificantes para proto cadherinas (*Pcdhb19*, *Pcdhb14*, *Pcdhb20*, *Pcdhb9*, *Pcdhb5*, *Pcdh15*, *Pcdhb21*, *Pcdh20*, *Pcdhb12*, *Pcdhb11*, *Pcdhb22*, *Pcdha6*, *Pcdhga6*, *Pcdhb8*, *Pcdhb6*, *Pcdhga5*, *Pcdhb3*, *Pcdhgb5*, *Pcdha4*, *Pcdhb7*, *Pcdhb4*, *Pcdhgb4*, *Pcdhgb7*, *Pcdhb10*, *Cdh22* y *Cdh20*) y 4 cadherinas (*Cdh19*, *Cdh18*, *Cdh13* y *Cdh23*). De la misma forma que en el RNA-seq de ratón, la reducción de expresión de estas proteínas refuerza la hipótesis de la desconexión de la célula ciliada con su aferente.

Además, en concordancia con los datos de RNA-seq de ratón, también hubo un incremento en algunos componentes de la vía de señalización por interferón (*Stat1*, *Stat2*, *Myd88*, *Trim25*, *Ddx58*, *Ifnar2*, *Irf7* y *Irf9*), así como genes estimulados por éste (*Isg15*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Usp18*, *Tap1*, *Irf1*, *Ch25h*, *Mx2*, *Bst2*, entre otros). Adicionalmente, el aumento en la expresión de genes relacionados con la activación de Toll-Like Receptors (*Fos*, *Mapk13*, *Irf7*, *Stat1*, *Cxcl10*) y RIG-I-like receptor (*Ddx58*, *Ifih1*, *Isg15*, *Mapk13*, *Irf7*, *Cxcl10*) sugiere que la ototoxicidad por IDPN podría activar las vías de respuestas a interferón mediante mecanismos alternativos a la vía canónica. Algunos ejemplos son los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) o las señales de peligro.

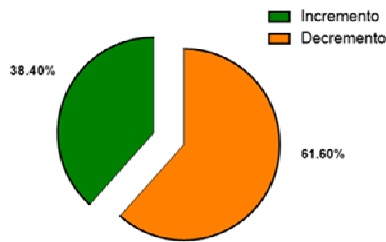
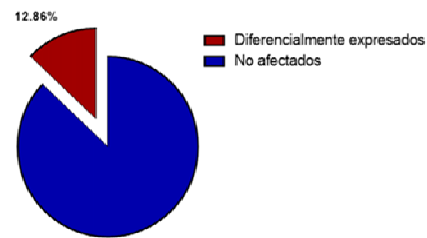
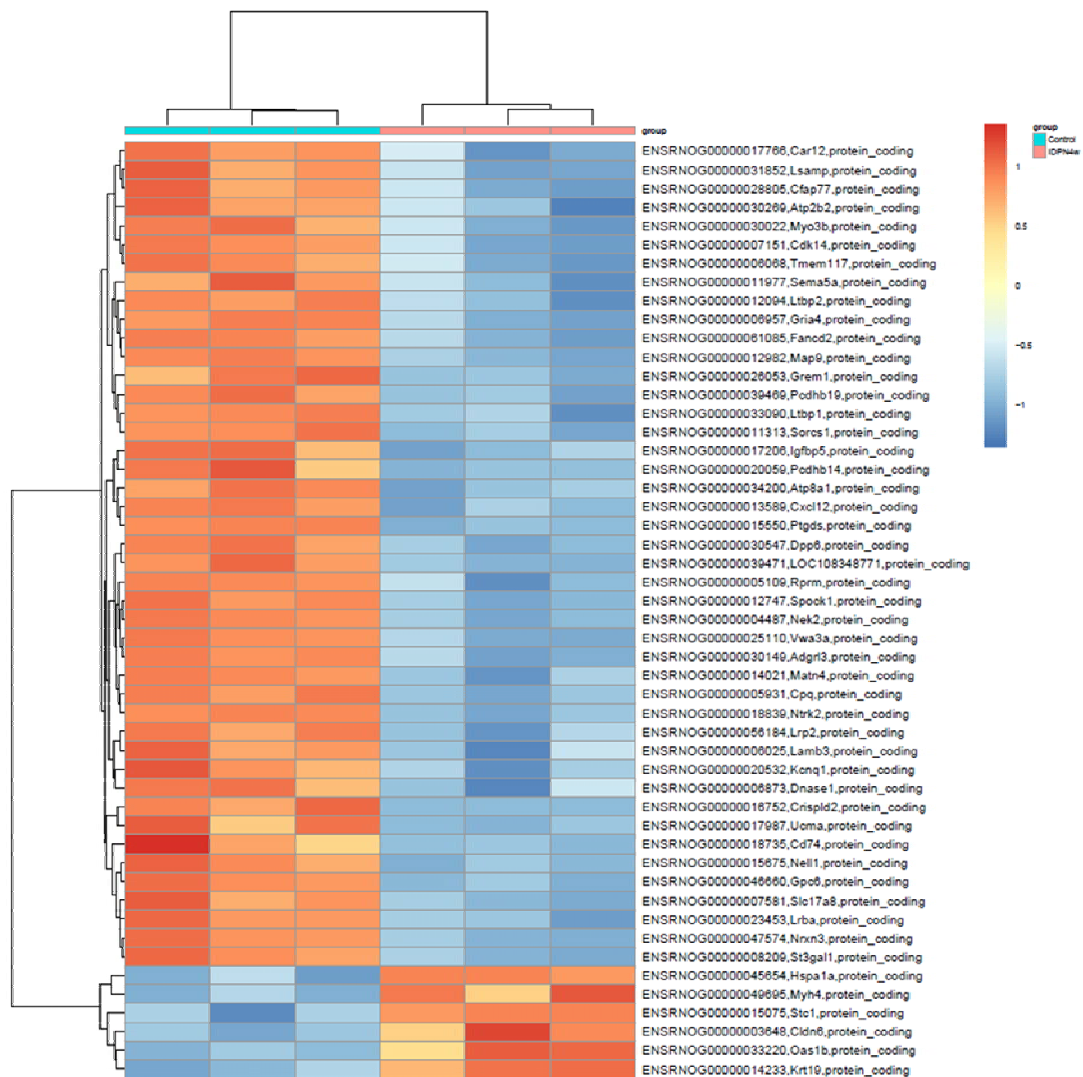
A**Genes diferencialmente expresados en epitelio****B****Total de genes analizados en epitelio****C**

Figura R62. Efecto del tratamiento con IDPN (20mM en agua de bebida durante 4 semanas) sobre el transcriptoma del epitelio sensorial vestibular en ratas Long Evans macho. A: Porcentaje de genes diferencialmente expresados en los que existe un incremento (verde) o decremento (naranja) de expresión en tratados respecto a los controles. B: Porcentaje de genes diferencialmente expresados (rojo) del total de 22250 secuencias codificantes analizadas. C: Mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados en los que hay una mayor significación estadística. En la parte superior de la tabla, las tres primeras barras (en azul) corresponden a las ratas control y las tres últimas (en rosa) a las tratadas. Los genes en azul indican un decremento de expresión y las rojas un incremento respecto a las dos condiciones experimentales.

4.5 Efecto de la estreptomicina en el transcriptoma del epitelio vestibular de rata

En este tercer RNA-seq se comparó el transcriptoma del epitelio sensorial vestibular (seis crestas y dos utrículos) de dos animales macho y una hembra tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg diaria durante 6 semanas con dos machos y una hembra controles. Los resultados funcionales en el análisis de ángulo mínimo de tail-lift fueron los siguientes para los animales del estudio: 84, 97 y 114 grados en los tratados y 137,171 y 162 grados en los controles.

De las 22250 secuencias de ARN mensajero codificantes, hubo 647 (2.91%) diferencialmente expresadas de forma estadísticamente significativa. De entre estos, en 367 (56.72%) hubo un incremento de expresión y en 280 (43.28%) un decremento, en tratados respecto a control. La Figura R63 representa el mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados con mayor significación estadística, con el 60% de ellos incrementados en tratados.

El análisis funcional KEGG, mostró numerosas vías moleculares alteradas. En este análisis apareció una menor expresión de multitud de genes relacionados con procesos metabólicos: glicólisis (*Aldh3a1*, *Ldha*, *Pfkl*, *Acss2*, *Pgk1*, *Eno1*, *Pfkm*, *Pgm1*), metabolismo de la galactosa (*Pfkl*, *Akr1b1*, *Pfkm*, *Pgm1*), metabolismo del nitrógeno (*Car2*, *Car12*, *Car7*) y biosíntesis de aminoácidos (*Pfkl*, *Pgk1*, *Eno1*, *Pfkm*).

Los resultados del análisis también sugirieron un incremento en la actividad de las células ciliadas en relación con la sinapsis. Se registró un aumento en la expresión de genes relacionados con: potenciación a largo plazo (*Ppp3r1*, *Ppp3cc*, *Rap1a*, *Ppp1r1a*, *Kras*, *Atf4*, *Grin1*), sinapsis glutamatérgicas (*Ppp3r1*, *Ppp3cc*, *Gnas*, *Slc38a2*, *Gnai1*, *Grin1*), sinapsis dopaminérgicas (*Ddc*, *Ppp3cc*, *Gnas*, *Gnai1*, *Atf4*) y señalización por neurotrofinas (*Rap1a*, *Pdpk1*, *Ripk2*, *Irak3*, *Kras*, *Crk*, *Atf4*). No obstante, es importante remarcar la disminución de BDNF, una neurotrofina importante en el desarrollo neuronal.

En cuanto a la adhesión celular, una serie de genes relacionados con las uniones GAP de las sinapsis se vieron disminuidos (*Tubb3*, *Gnas*, *Kras*, *Gnai1*) y otros incrementados (*Itpr3*, *Tubb4a*, *Tubb6*). A diferencia del modelo de IDPN en rata y ratón, con estreptomicina no hubo una disminución clara de cadherinas o proto cadherinas y, del mismo modo, tampoco aparecieron diferencialmente expresados genes relacionados con la activación de la señalización por interferón.

Por último, algunos genes involucrados en la división, crecimiento celular y señalización por MAPK se vieron disminuidos a causa del antibiótico.

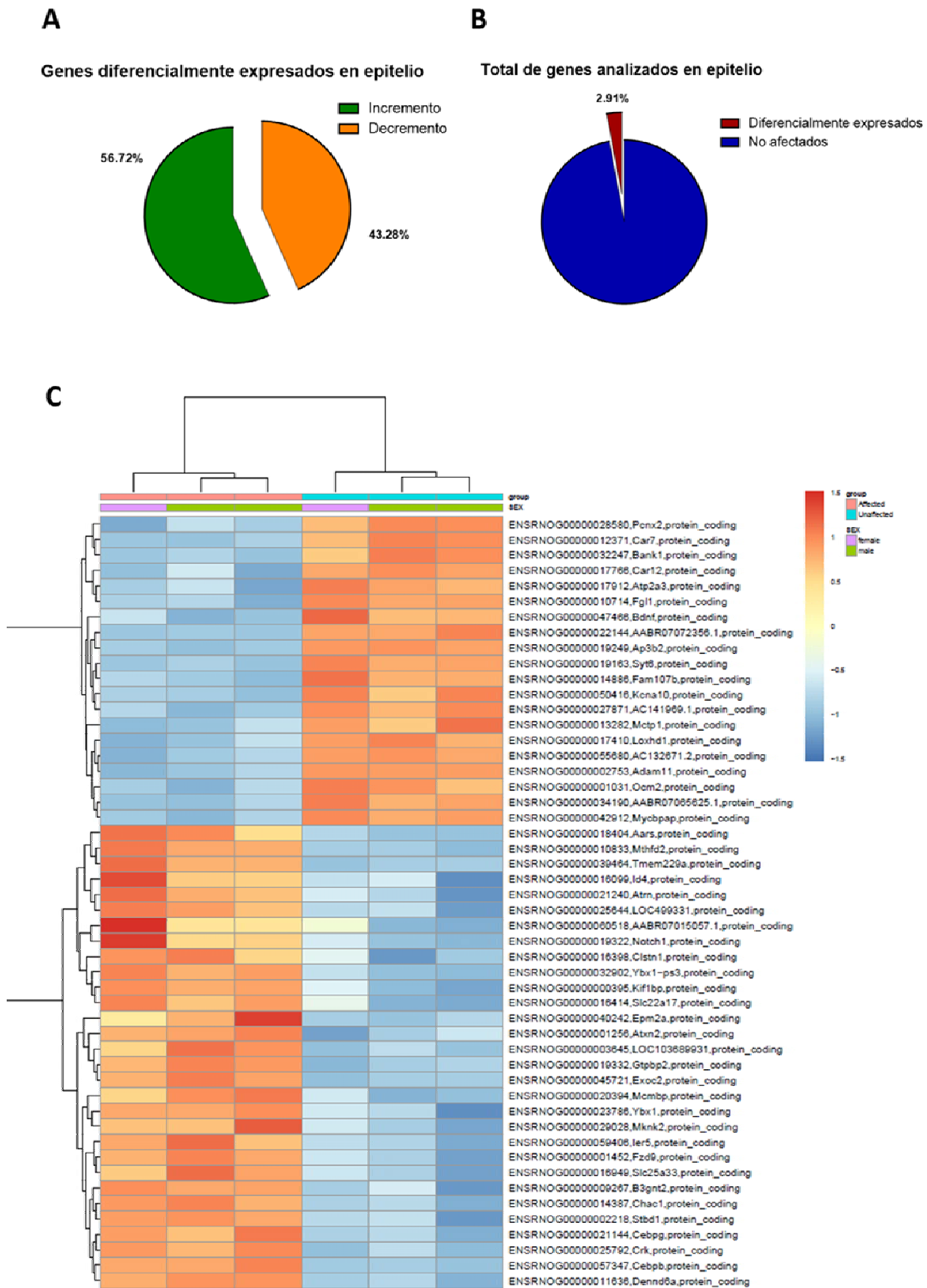


Figura R63. Efecto del tratamiento con estreptomicina (500mg/kg subcutánea durante 6 semanas) sobre el transcriptoma del epitelio sensorial vestibular en ratas Long Evans (dos machos y una hembra por grupo). A: Porcentaje de genes diferencialmente expresados en el que hay un incremento (verde) o decremento (naranja) en tratados respecto a controles. B: Porcentaje de genes diferencialmente expresados (rojo) del total de 22250 secuencias codificantes analizadas. C: Mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados en los que hay una mayor significación estadística. En la parte superior de la tabla, las tres primeras barras (en rosa) corresponden a las ratas tratadas y las tres últimas (en azul) corresponden a las control. Los genes en azul indican un decremento de expresión y las rojas un incremento respecto a las dos condiciones experimentales.

4.6 Estudio comparativo de los tres modelos en epitelio

Se encontraron grandes concordancias entre el RNA-seq de rata y ratón expuestos a IDPN, a pesar de tratarse de especies diferentes. En epitelio se hallaron 474 genes comunes, el 17% del total de genes diferencialmente expresados en rata y el 42% en ratón. Además, el 97% de ellos siguieron una concordancia en el aumento o disminución de la expresión génica en ambos modelos. Estas similitudes otorgan robustez al estudio y permitirán descubrir vías moleculares comúnmente alteradas.

En contraposición, al realizar el análisis comparativo añadiendo los datos del RNA-seq de estreptomycin a los de IDPN, los puntos en común bajaron considerablemente, indicando la presencia de mecanismos moleculares diferentes en la ototoxicidad provocada por ambos compuestos.

La figura R64 representa el análisis comparativo de los tres modelos en epitelio.

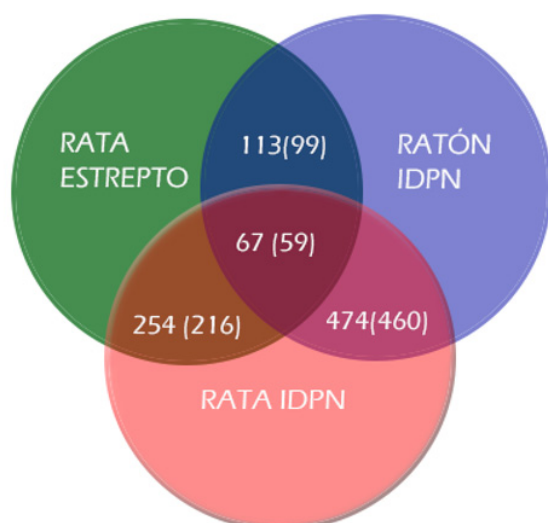


Figura R64. Diagramas circulares en los que se muestran los genes diferencialmente expresados y comunes en epitelio entre los RNA-seq de epitelio en rata (rojo) y ratón (azul) tratados con IDPN en agua de bebida (20mM 4 semanas y 30mM 7 semanas respectivamente) y rata tratada con estreptomycin (500mg/kg durante 6 semanas) (verde). Entre paréntesis se indican los genes en que, además de ser comunes, existe una concordancia en el incremento o la disminución de expresión registrada.

4.7 Análisis por inmunohistoquímica de *Spp1* y *Ocm2*, dos genes diferencialmente expresados en los tres modelos

Con el objetivo de trasladar algunos de los resultados observados del RNA-seq a expresión proteica, se seleccionaron dos genes diferencialmente expresados en los tres modelos para su posterior estudio por inmunohistoquímica: *Spp1* y *Ocm2*. Ambos tuvieron una marcada disminución en la expresión génica de las ratas tratadas, y, adicionalmente, la disponibilidad de anticuerpos funcionalmente validados junto a su síntesis en grandes cantidades facilitó la observación y cuantificación.

Spp1 es una proteína propia de la matriz extracelular con una función importante en osteogénesis y condrogénesis. Se encuentra presente en el citoplasma de las células ciliadas de tipo I (McInturff et al., 2018) y en las otoconias (Sakagami, 2000). Se ha sugerido que puede

tener un papel en la regulación iónica de la endolinfa (Sakagami, 2000).

Para estudiar esta proteína se procesaron crestas de ratas control, tratadas con estreptomicina (una vez al día a 500mg/kg durante 6 semanas) y recuperación para su procesamiento por inmunohistoquímica, con Caspr1, Spp1 y NF200 como marcadores. La Figura R65 muestra las imágenes de esta proteína para las tres condiciones experimentales estudiadas.

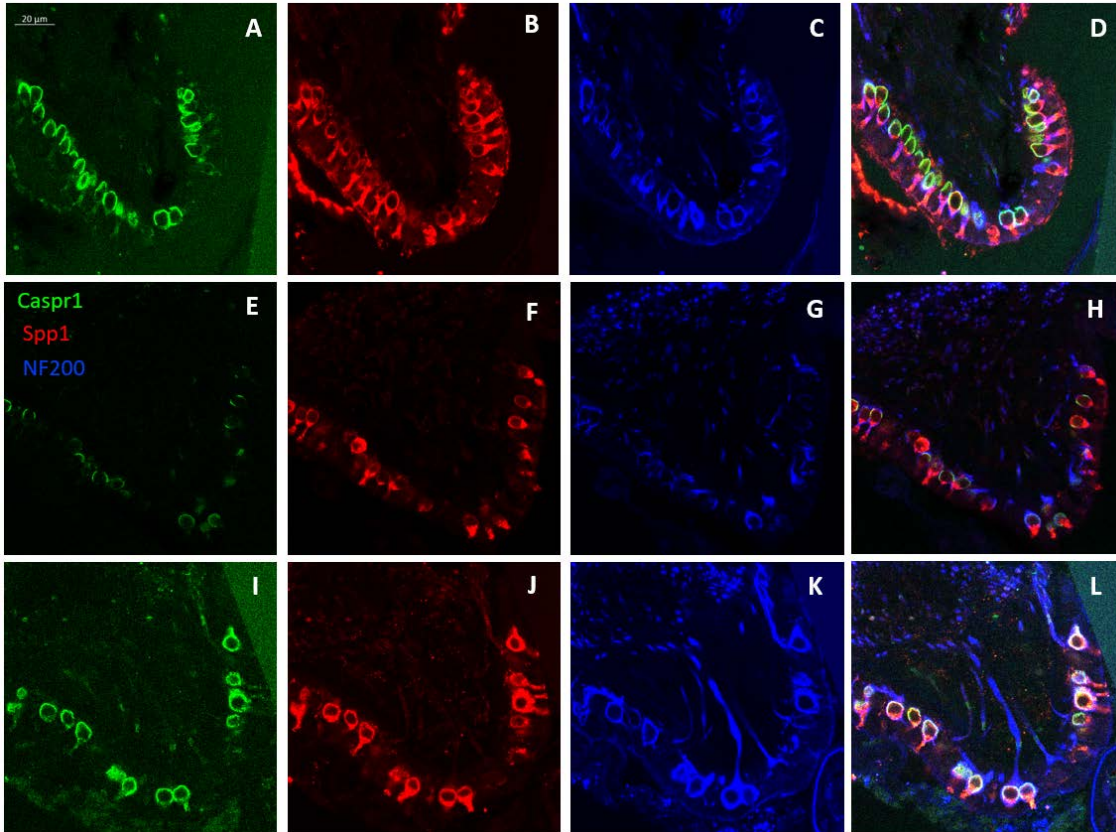


Figura R65. Efecto de la estreptomicina en la proteína Spp1. En las imágenes se muestra Caspr1 (verde: A, E e I), Spp1 (rojo: B, F y J) y NF200 (azul: C, G y K). En la columna de la derecha (D, H y L) aparecen conjuntamente los tres marcajes. A-D. Cresta de un individuo control. E-H. Cresta de un animal expuesto a estreptomicina durante 6 semanas. I-L. Cresta de un animal expuesto a estreptomicina durante 6 semanas con 10 semanas de recuperación.

La Figura R66 muestra el análisis cuantitativo en la fluorescencia de Spp1. Los datos indican una reducción significativa del 27% en las HCl de las ratas tratadas con respecto a las control. Asimismo, los niveles de fluorescencia se restablecieron por completo en los animales que tuvieron un periodo de recuperación, con valores similares a los controles. Por otro lado, la disminución de expresión génica que se registró en el RNA-seq fue del 25.8%.

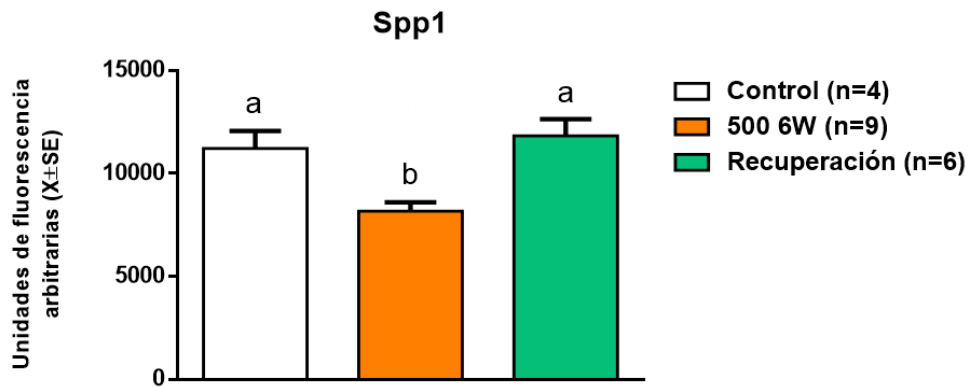


Figura R66. Efecto de la administración de estreptomicina a 500mg/kg sobre la proteína Spp1 en cresta. Se estudiaron el grupo control, el grupo al que se administró estreptomicina una vez al día a una dosis de 500mg/kg durante 6 semanas y el de recuperación. Se incluyeron en el análisis machos y hembras. Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células por animal y el grosor de cada imagen fue de 0.5 μ m en un stack total de 25 μ m. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa ($F(2,16): 10.450 p = 0.001$). Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados con estreptomicina una vez al día durante 6 semanas; Recuperación: animales tratados con estreptomicina durante 6 o 8 semanas con un periodo de recuperación de 8 o 10 semanas.

Por otro lado, Oncomodulina (codificada por *Ocm2*) es una proteína de unión al calcio expresada mayoritariamente por las células ciliadas de tipo I y una pequeña fracción de células ciliadas de tipo II de las zonas estriolares/centrales (Hoffman et al., 2018). Recientemente se ha estudiado su papel en la regulación de la motilidad de las células cocleares mediante mecanismos dependientes de calcio (Climer et al, 2019).

La Figura R67 representa el análisis cuantitativo de fluorescencia de la proteína Oncomodulina junto al recuento de células positivas para esta proteína. Los niveles de fluorescencia fueron similares entre las células ciliadas de animales control y tratados, pero sí que hubo una reducción en el número de células que expresaban la proteína. Los resultados sugieren que la reducción reflejada en el RNA-seq probablemente se debió a una pérdida significativa en el número de células que la expresaban y no a una modulación en la expresión de ésta.

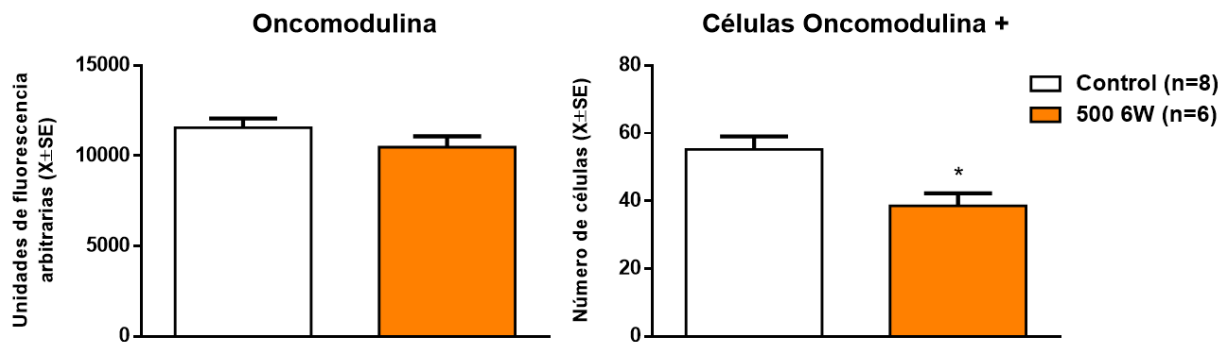


Figura R67. Efecto de la administración de estreptomicina en la proteína Oncomodulina (A) y en el número de células que la expresan (B) en cresta. Se comparó el grupo control y tratado con estreptomicina. Se incluyeron en el análisis machos y hembras. Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células en un grosor por imagen de 0.5 μ m en un stack total de 25 μ m. Los recuentos de células corresponden al número medio de células por cada 3 μ m de epitelio sensorial. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control después del análisis T-student. (Oncomodulina $p > 0.05$, células Oncomodulina + $p = 0.013$). Control: animales tratados con PBS; 500 6W: animales tratados con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg una vez al día durante 6 semanas.

4.8 Análisis de las proteínas Spp1, Myo7a y calretinina en el modelo de IDPN en rata

Una vez se estudió Spp1 por inmunohistoquímica en el modelo de estreptomycin, se quiso trasladar este mismo resultado al modelo de IDPN en rata. Y, además de ésta, también se estudiaron Myo7a, una proteína que apareció disminuida en el RNA-seq de los dos modelos de rata (IDPN y estreptomycin), y calretinina, de la que hay una menor expresión en ambos modelos de IDPN. Para ello, se procesaron crestas de ratas expuestas a IDPN a 20mM durante cuatro semanas mediante inmunohistoquímica. Las muestras se procesaron en dos periodos de tiempo diferentes, por lo fue necesario normalizar los resultados respecto a la media del grupo control de cada lote.

La Figura R68 indica reducciones significativa en Spp1 y calretinina pero no en Myo7a en tratados respecto a los controles. Éstas fueron del 44% y 58% en Spp1 y calretinina respectivamente. En el análisis de RNA-seq del modelo de IDPN de rata la reducción en la expresión fue del 72% y 78% en Spp1 y calretinina respectivamente.

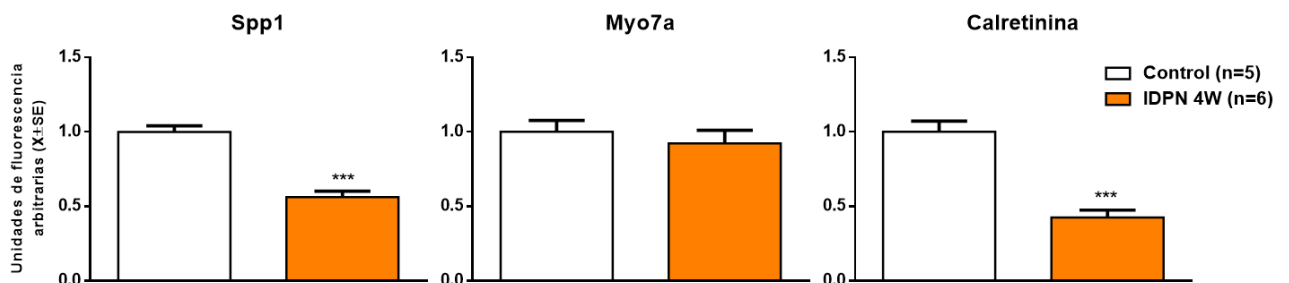


Figura R68. Efecto de la exposición crónica de IDPN a una concentración de 20mM durante 4 semanas en agua de bebida en las proteínas Spp1, Myo7a y calretinina en cresta. Se calculó la fluorescencia total media de 30 células por rata y el grosor de cada imagen fue de 0.5 μ m en un stack total de 25 μ m. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control después del análisis T-student. Spp1 $p = 0.000$, Myo7a $p > 0.05$ y calretinina $p = 0.000$.

CAPÍTULO V: ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE LOS MODELOS DE IDPN Y ESTREPTOMICINA EN GANGLIO

5.1 Objetivo principal

Al mismo tiempo que se realizaron los RNA-seq de epitelio en los tres modelos, se hicieron los equivalentes en ganglio para los mismo animales tratados y control. Con esta segunda aproximación transcriptómica se pretendió conocer los procesos moleculares propios de la degeneración ototóxica en las aferentes de las células ciliadas.

5.2 Estudio de RNA-seq en ganglio de ratones expuestos a IDPN

Del mismo modo que en el caso del epitelio, el RNA-seq se realizó durante el curso de la tesis doctoral de Erin Greguske en ratones macho expuestos durante 8 semanas a IDPN a una concentración de 30mM. El estudio comparó el transcriptoma del ganglio vestibular de tres

animales control y tratados (con unas puntuaciones de Vestibular Dysfunction Rating o VDRs de 7, 14, 14).

De las 13532 secuencias de ARN mensajero codificantes para proteína disponibles, 956 (7.06%) genes fueron diferencialmente expresados (DE) entre controles y tratados. Y de entre estos, 436 (45.61%) fueron regulados positivamente, mientras que en 520 (54.39%) hubo una menor expresión en tratados respecto a controles.

Algunos de los resultados obtenidos fueron corroborados por Erin Greguske mediante el análisis de qRT-PCR (*Slc17a6*, *Camk1g*, *Kcnq5*, *Chrna6*, *Ngfr*, *Nptx2*, *Slc2a4*), que de manera similar mostraron una expresión reducida en ambas aproximaciones experimentales. Adicionalmente, la base de datos RNA-seq confirmó resultados previos de qRT-PCR, como la disminución en la expresión de *Gria2* (gen del receptor GluA2) (Greguske et al., 2019).

El análisis funcional de la base de datos KEGG destacó con una mayor significación estadística los procesos moleculares relacionados con el ciclo de vesículas sinápticas, mostrando una reducción en la expresión de algunos genes implicados. Entre estos se incluyeron: *Syt1*, *Stxbp1*, *Atp6v0a1*, *Atp6v1b2*, *Cltc*, *Stx1b*, *Ap2b1*, *Slc17a6*, *Vamp2*, *Unc13a*, *Atp6v1a* y *Ap2a1*. Además, de entre la lista anterior, el que tuvo una reducción más significativa fue el transportador vesicular de glutamato, *Slc17a6*, cuyo nivel de expresión ha sido relacionada con la actividad neuronal (Doyle et al., 2010).

Adicionalmente, se encontraron disminuciones muy significativas en la expresión de otros genes cuyo nivel de expresión también depende de la actividad neuronal, como *Camk1g* y *Nptx2* (Xu et al., 2003; Doyle et al., 2010; Harrill et al., 2010). Los datos sugieren una reducción en la expresión de las proteínas implicadas en el recambio de vesículas sinápticas en asociación con una menor actividad de las neuronas del ganglio vestibular.

5.3 Estudio de RNA-seq en ganglio de ratas expuestas a IDPN

El estudio de RNA-seq en el modelo de IDPN en rata realizado en esta tesis comparó el transcriptoma de ganglios vestibulares de animales macho tratados con IDPN a una concentración de 20mM en agua de bebida durante cuatro semanas respecto a controles. Los resultados de comportamiento de tail-lift fueron los siguientes para los animales del estudio: 45, 26 y 40 en los tratados y 149, 150 y 150 en los controles. De las 22250 secuencias de ARN mensajero codificantes para proteína, hubo 919 (4.13%) diferencialmente expresadas de forma estadísticamente significativa. De entre estos genes, en 368 (40.04%) hubo un incremento de expresión y en 551 (59.95%) un decremento, en tratados respecto a controles. La Figura R69 representa el mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados con mayor significación estadística. Se observa que en la mayoría de ellos (86%) existe una menor expresión en tratados respecto a control.

El análisis funcional realizado a partir de la bases de datos KEGG mostró numerosas vías moleculares que podrían estar afectadas a causa del tratamiento (con un p valor inferior a 0.05). En este análisis se observó un decremento en genes relacionados con vías metabólicas como glicolisis (*Ldha*, *Tpi1*, *Pgam1*, *Eno1*, *Pgm1*, *Hk1*), metabolismo del carbono (*Tpi1*, *Shmt2*, *Pgam1*, *Dlst*, *Ogdhl*, *Phgdh*, *Eno1*, *Hk1*) y procesamiento proteico en el retículo endoplasmático (*Hspa5*, *Hspa4l*, *Eif2ak2*, *Ube4b*, *March6*, *Dnajc5*, *Capn1*, *Calr*, *Atf4*). Además de los anteriores, se registró una menor expresión en 52 genes relacionados con el metabolismo, no asociados en la base de datos KEGG a ninguna vía en concreto.

En concordancia con los datos de epitelio, los resultados sugirieron que el tratamiento por IDPN provoca un incremento en la expresión de genes relacionados con la activación del sistema inmunológico. Ejemplos de ello son una mayor expresión de genes relacionados con la señalización por Toll Like Receptors (*Nfkb1a*, *Cxcl11*, *Jun*, *Akt1*, *Pik3cb*, *Cd14*, *Mapk3*), células B y T (*Nfkb1a*, *Jun*, *Akt1*, *Pik3cb*, *Mapk3*), quimiocinas (*Rock2*, *Src*, *Pxn*, *Pik3cb*, *Nfkb1a*, *Cxcl11*, *Adcy9*, *Akt1*, *Mapk3*) o respuesta a la infección en la enfermedad de Chagas (*Nfkb1a*, *Jun*, *Smad3*, *Akt1*, *Pik3cb*, *Mapk3*).

El análisis también mostró una disminución en la señalización por PI3K-Akt (*Pik3cd*, *Thbs2*, *Comp*, *Gys1*, *Spp1*, *Them4*, *Fgf21*, *Ngfr*, *Lamb3*, *Itga3*, *F2r*, *, *Col1a1*, *Col3a1*, *Pik3ap1*, *Fgf12*, *Atf4*, *Fgf10*), en el sistema de señalización por fosfatidilinositol (*Dgkg*, *Plcb4*, *Synj1*, *Dgkq*, *Inpp5j*, *Pik3cd*, *Synj2*, *Cds2*) y en el metabolismo de inositol fosfato (*Isyna1*, *Tpi1*, *Plcb4*, *Synj1*, *Inpp5j*, *PIK3CD*, *Synj2*).*

Al igual que en ratones, el análisis funcional destacó el ciclo de las vesículas sinápticas como altamente significativa, y en la mayoría de los genes destacados hubo una menor expresión. Entre ellos se incluyen: *Atp6v1a*, *Unc13a*, *Slc17a6*, *Ap2b1*, *Atp6v0e2*, *Vamp2*. Éstos intervienen en la liberación de neurotransmisores, en procesos sensoriales regulados por calcio y en la conformación estructural/exocitosis de las vesículas.

Por último, el análisis reforzó la hipótesis de separación entre la neurona y célula ciliada a través de un descenso en la expresión de ARN mensajeros de proteínas relacionadas con adhesión focal (*Lamb3*, *Itga3*, *Fn1*, *Pik3cd*, *Thbs2*, *Col1a1*, *Comp*, *Col3a1*, *Spp1*, *Pak3*).

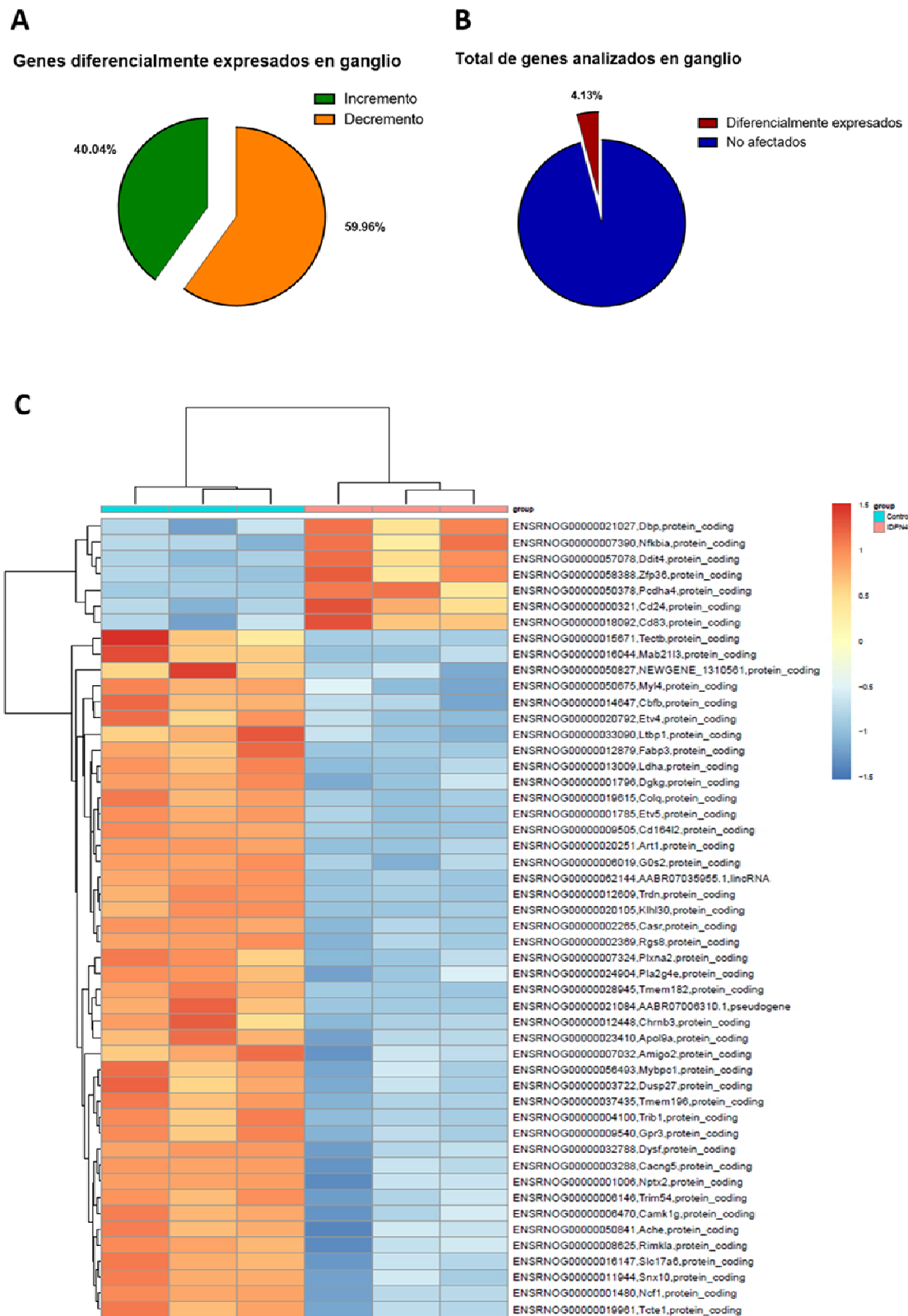


Figura R69. Efecto del tratamiento con IDPN (20mM en agua de bebida durante 4 semanas) en machos sobre el transcriptoma del ganglio vestibular en ratas Long Evans. A: Porcentaje de genes diferencialmente expresados en el que hay un incremento (verde) o decremento (naranja) en tratados respecto a controles. B: Porcentaje de genes diferencialmente expresados (rojo) del total de 22250 secuencias codificantes analizadas. C: Mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados en los que hay una mayor significación estadística. En la parte superior de la tabla, las tres primeras barras (en azul) corresponden a las ratas control y las tres últimas (en rosa) corresponden a las tratadas. Los genes en azul indican un decremento de expresión y las rojas un incremento respecto a las dos condiciones experimentales.

5.4 Estudio del efecto de la estreptomycin en el transcriptoma del ganglio vestibular en ratas mediante un análisis de RNA-seq

El segundo estudio de RNA-seq en el modelo de estreptomycin comparó el transcriptoma de los ganglios vestibulares de dos ratas macho y una hembra tratados con estreptomycin y el mismo número de animales de cada sexo control. Los resultados de comportamiento de tail-lift fueron los siguientes en los animales seleccionados: 84, 101 y 114 grados en los tratados y 137,171 y 162 grados en los controles. De las 22250 secuencias de ARN mensajero codificantes para proteína, hubo 3747 (16.8%) diferencialmente expresadas y con un p valor ajustado menor a 0.05. De entre estos, 2015 (53.7%) registraron un incremento de expresión y 1732 (46.2%) un decremento, en tratados respecto a controles. La Figura R70 representa el mapa de calor donde se encuentran los 50 genes diferencialmente expresados con mayor significación estadística. Curiosamente, y a diferencia de los modelos de IDPN, se observó en gran parte de ellos un incremento de expresión en tratados respecto a controles.

El análisis funcional realizado a partir de la base de datos KEGG señaló la existencia de numerosas vías moleculares potencialmente afectadas por el tratamiento. A la inversa que en el modelo de IDPN en rata y epitelio en estreptomycin, el análisis resaltó un incremento en la actividad metabólica en procesos como la glicolisis, metabolismo del carbono y piruvato, biosíntesis de aminoácidos y ciclo del citrato.

Además, hubo un incremento en 51 genes asociados con la fosforilación oxidativa y la respuesta al estrés oxidativo (*Cox7b*, *Ndufa12*, *Atp5c1*, *Cox7c*, *Uqcrrf1*, *Atp6v1e1*, *Atp6v1g2*, *Ndufa10l1*, *Ndufc2*, *Ndufc1*, *Sdha*, *Sdhb*, *Cox7a2l*, *Ppa2*, *Ndufs7*, *Ndufs5*, *Ndufs4*, *Uqcrc1*, *Atp6v1b2*, *Ndufs1*, *Ndufs2*, *Ndufs3*, *Uqcrc2*, *Atp6v1a*, *Ndufb9*, *Ndufb6*, *Ndufb5*, *Cox17*, *Ndufb3*, *Cox7a2l2*, *Atp5h*, *Cox5b*, *Cox5a*, *Uqcrrh*, *Atp6v1h*, *Cox11*, *Cyc1*, *Ndufv2*, *Atp6v0e2*, *Atp6v1d*, *Ndufv1*, *Atp6v1c1*, *Atp6v1f*, *Atp6v0a1*, *Ndufa9*, *Ndufa6*, *Ndufa5*, *Ndufa4*, *Ndufa3*, *Cox6c*, *Ndufab1*).

Al igual que en el modelo de IDPN, el análisis reforzó la hipótesis de separación entre la neurona y célula ciliada a través de un descenso en la expresión de ARN mensajeros de proteínas relacionadas con adhesión focal, moléculas de adhesión celular (CAMs) y uniones gap, necesarias para la sinapsis. Se reflejó un decremento en los genes: *lpar1*, *Adcy4*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Adcy2*, *Adcy6*, *Egfr*, *Gnai2*, *Tuba1c*, *Gja1*, *Tubb6*, *Mapk7*, *Pdgfc*, *Tubb1*, *Mapk3*, *Pdgfrb*, *Pdgfra*, *Plcb3*, *Tubb2b*.

Por último, y de la misma forma que en epitelio con estreptomycin, hubo una disminución de genes involucrados en la división y crecimiento celular a causa del antibiótico.

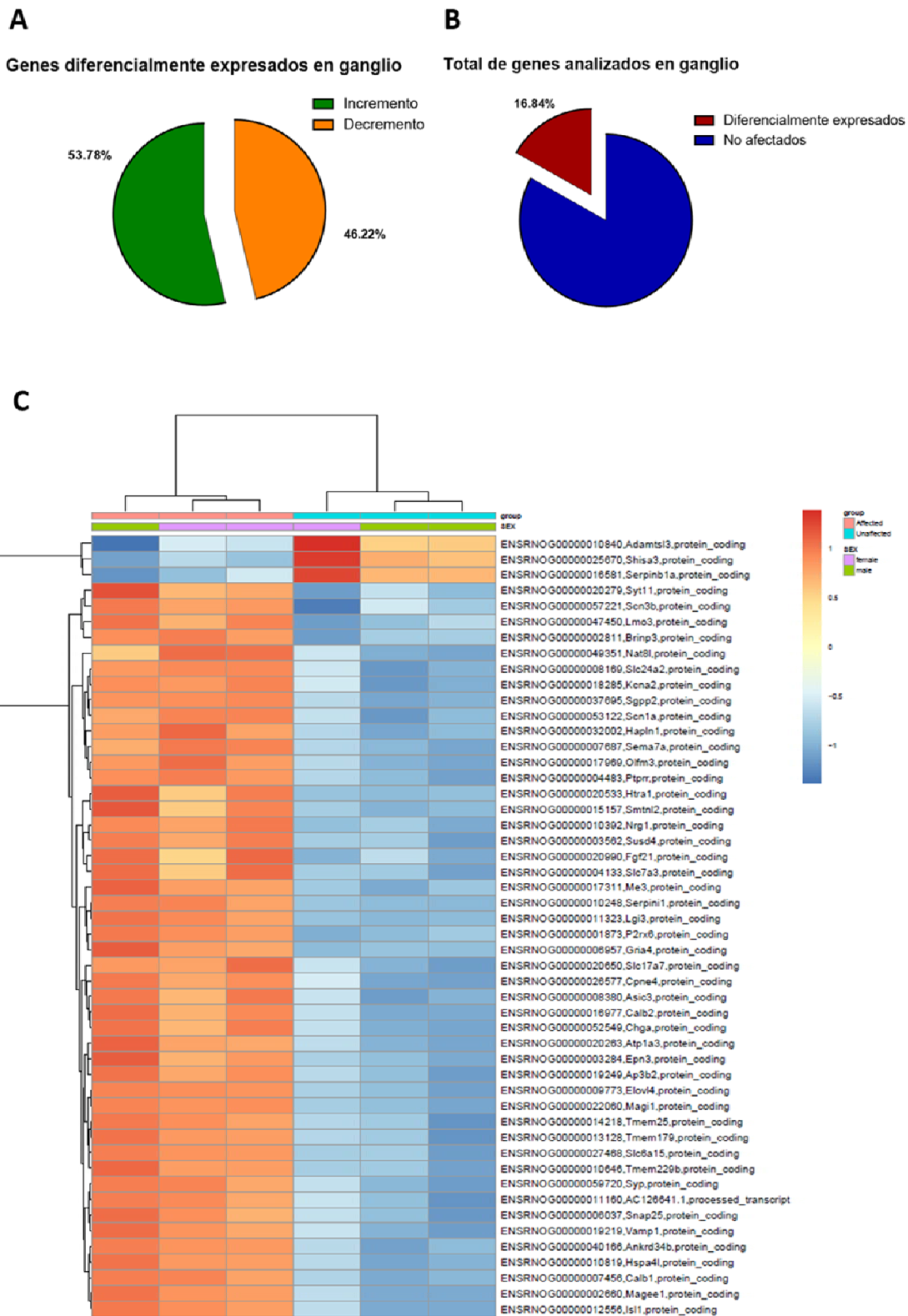


Figura R70. Efecto del tratamiento con estreptomicina (500mg/kg subcutánea durante 6 semanas) sobre el transcriptoma del ganglio vestibular en ratas Long Evans (dos machos y una hembra por cada grupo). A: Porcentaje de genes diferencialmente expresados en el que hay un incremento (verde) o decremento (naranja) en tratados respecto a control. B: Porcentaje de genes diferencialmente expresados (rojo) del total de 22250 secuencias codificantes analizadas. C: Mapa de calor de los 50 genes diferencialmente expresados en los que hay una mayor significación estadística. En la parte superior de la tabla, las tres primeras barras (en rosa) corresponden a las ratas tratadas y las tres últimas (en azul) a las control. Los genes en azul indican un decremento de expresión y las rojas un incremento respecto a las dos condiciones experimentales.

5.5 Estudio comparativo de los tres modelos en ganglio

En concordancia con los datos de epitelio, en ganglio también se encontraron grandes similitudes en el análisis de ambos modelos de IDPN. Hubo 213 genes comunes diferencialmente expresados en rata y ratón, el 22 y 23% del total de genes diferencialmente expresados respectivamente. Además, el 98.12% de ellos tuvieron una concordancia de expresión en ambos modelos, es decir, cuando un gen se encontraba aumentado o disminuido en una especie, en la otra también.

Del mismo modo que en el estudio comparativo de epitelio, al realizar el análisis conjunto de los tres modelos en ganglio, el nivel de concordancia bajó considerablemente. Se encontraron 105 genes comunes para los tres modelos y solo 15 de ellos con una concordancia en la expresión.

La figura R71 representa el análisis comparativo de los tres modelos en ganglio.

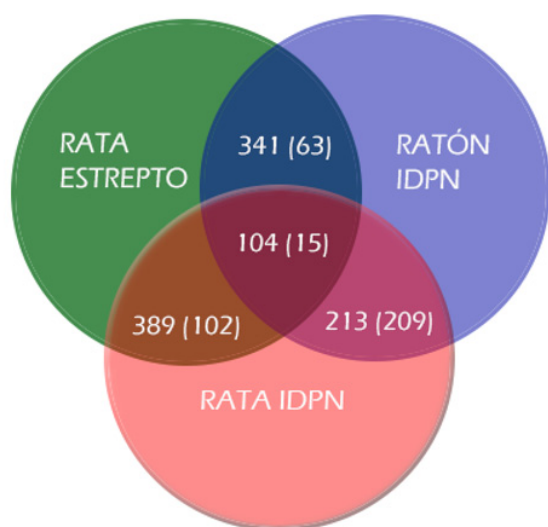


Figura R71. Diagramas circulares en los que se representan los genes diferencialmente expresados y comunes entre los RNA-seq de ganglio en rata (rojo) y ratón (azul) tratados con IDPN en agua de bebida (20mM 4 semanas y 30mM 7 semanas respectivamente) y rata tratada con estreptomicina (500mg/kg durante 6 semanas) (verde). Entre paréntesis aparecen los genes que, además de ser comunes, tienen una concordancia en el incremento o la disminución de la expresión registrada.

5.6 Efecto de la estreptomicina en las proteínas calretinina, NF200 y FGF12 en ganglio

Con el objetivo de averiguar si las alteraciones de expresión génica en los estudios de RNA-seq se correspondían a cambios en la síntesis proteica, se seleccionaron tres genes diferencialmente expresados en el modelo de estreptomicina para su posterior análisis mediante inmunohistoquímica. Los genes fueron *Calb2*, *Nefh* y *Fgf12*, y el criterio de selección fue la posición que ocupaban en el análisis a nivel estadístico y su correspondencia con los otros modelos de toxicidad.

La primera proteína seleccionada fue calretinina (codificada por *Calb2*), la cual ocupó la posición 16 en el análisis de RNA-seq de estreptomicina en ganglio. Además, hubo una disminución en la expresión de ésta en ambos modelos de IDPN en epitelio. Calretinina realiza funciones importantes en la señalización celular mediante su unión al calcio y se expresa en el citoplasma de las células ciliadas de tipo II y en subpoblaciones de neuronas ganglionares (Liu et al, 2014).

La segunda fue NF200 (codificada por *Nefh*), la cual forma la cadena pesada de los neurofilamentos, por lo que es un componente esencial de las fibras nerviosas. Se seleccionó esta proteína porque en el análisis de estreptomicina también apareció disminuido el gen que codifica para la cadena ligera (*Nefl*). El IDPN tiene un efecto conocido sobre los neurofilamentos (Chou & Hartmann, 1964; Griffin et al., 1978; Llorens & Rodríguez-Farré, 1997) y se quiso estudiar el posible impacto de la estreptomicina sobre ellos.

Por último, el FGF12 es un factor de crecimiento fibroblástico que participa en numerosos procesos como el crecimiento celular, la morfogénesis o la reparación tisular. En los últimos años se ha relacionado este factor con funciones vestibular y auditivas (Hanada et al, 2018). El gen que codifica para esta proteína apareció disminuido en el RNA-seq de los tres modelos en ganglio.

La Figura R72 muestra las imágenes de inmunohistoquímica en ganglios vestibulares con los tres marcadores, en ratas control y tratadas con estreptomicina a una dosis de 500mg/kg durante 6 semanas. A simple vista, se puede observar una menor fluorescencia para las proteínas FGF12 y calretinina a causa del tratamiento.

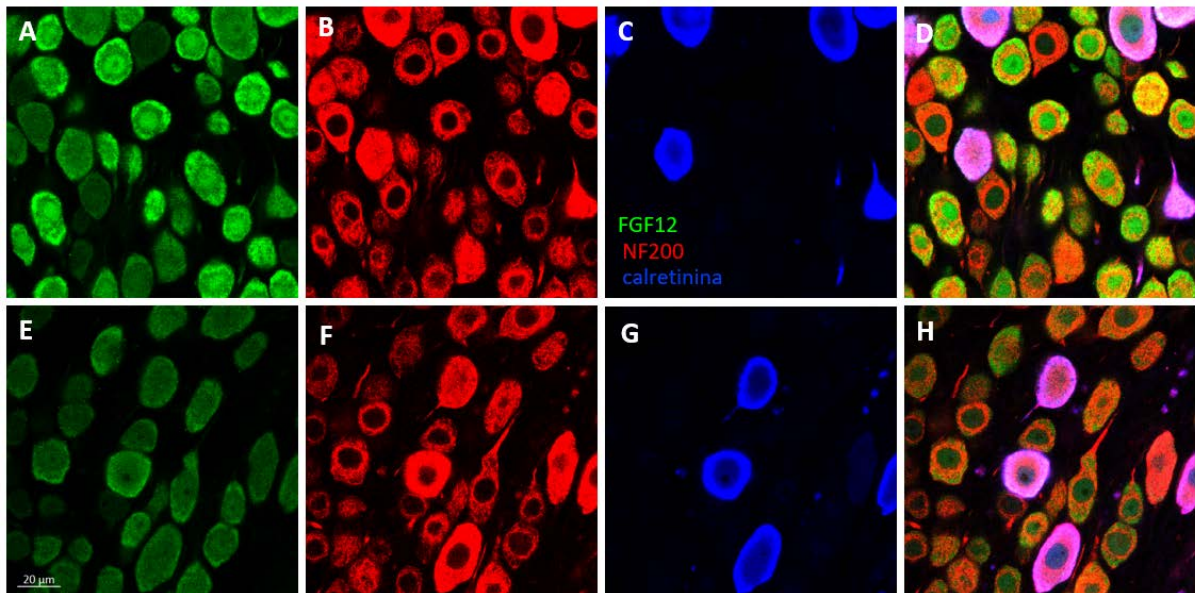


Figura R72. Efecto de la exposición a estreptomicina en las proteínas FGF12, NF200 y calretinina en ganglio. En las imágenes aparecen FGF12 (verde: A, y E), NF200 (rojo: B y F) y calretinina (azul: C y G). En la columna de la derecha (D y H) aparecen conjuntamente los tres marcajes. A-D. Cresta de un individuo control. E-H. Cresta de un animal expuesto a estreptomicina durante 6 semanas a una dosis de 500mg/kg.

La Figura R73 presenta la cuantificación de la fluorescencia para las tres proteínas, y la reducción significativa de calretinina y FGF12 en los animales tratados (25 y 38 por ciento respectivamente respecto a los controles). Por el contrario, no se observaron diferencias para NF200.

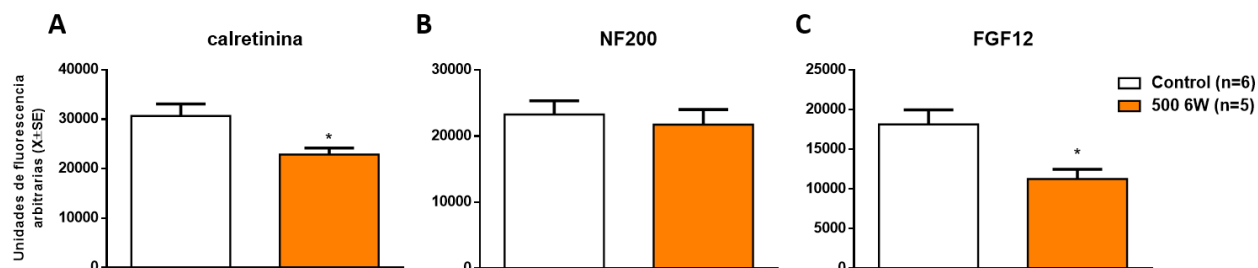


Figura R73. Efecto de la estreptomicina en las proteínas calretinina (A), NF200 (B) y FGF12 (C) en el ganglio vestibular. Se compararon el grupo control y el tratado con estreptomicina a nivel subcutáneo una vez al día a una dosis de 500mg/kg durante 6 semanas (500 6W). Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células por animal en inmunofluorescencia. El grosor de cada imagen fue de 0.5 μ m en un stack total de 25 μ m. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control después del análisis T-student (calretinina $p = 0.026$, NF200 $p > 0.05$, FGF12 $p = 0.013$).

5.7 Efecto de la exposición por IDPN en Spp1 y FGF12 en ganglio

Los genes que codifican para las proteínas Spp1 y FGF12, aparecieron disminuidos en los análisis de RNA-seq de los tres modelos estudiados. Para comprobar si los cambios de expresión eran traducidos a cambios proteicos, se procesaron por inmunohistoquímica ganglios vestibulares de ratas tratadas con IDPN y controles. Los marcajes utilizados fueron Spp1 y FGF12 como proteínas a estudiar junto con NF200 como marcador de los cuerpos neuronales. En la Figura R74 se observa la disminución de fluorescencia en ambas proteínas en los animales tratados.

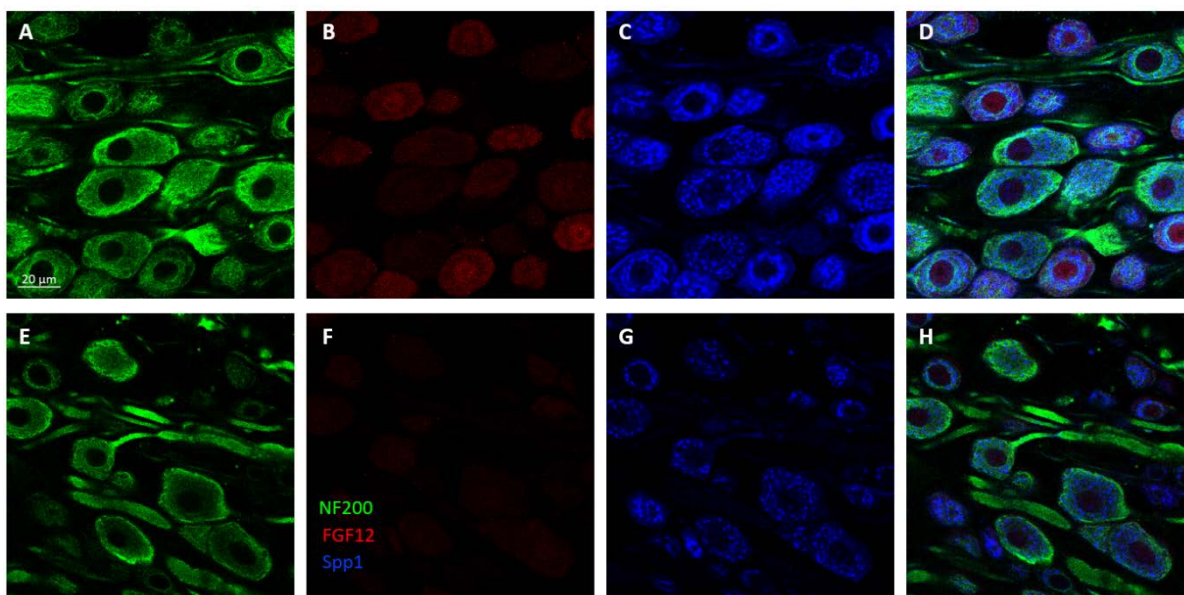


Figura R74. Efecto de la exposición a IDPN en las proteínas FGF12 y Spp1 en ganglio. En las imágenes aparecen NF200 (verde: A, y E), FGF12 (rojo: B y F) y Spp1 (azul: C y G). En la columna de la derecha (D y H) aparecen conjuntamente los tres marcajes. A-D. Cresta de un individuo control. E-H. Cresta de un animal expuesto a IDPN en agua de bebida a una concentración de 20mM durante 4 semanas.

A nivel cuantitativo hubo una disminución de ambas proteínas en animales tratados respecto al control del 27% en Spp1 y 51% en FGF12 (Figura R75). La reducción registrada a nivel de ARN mensajero en el RNA-seq de IDPN en rata fue del 26% y 39% en Spp1 y FGF12 respectivamente.

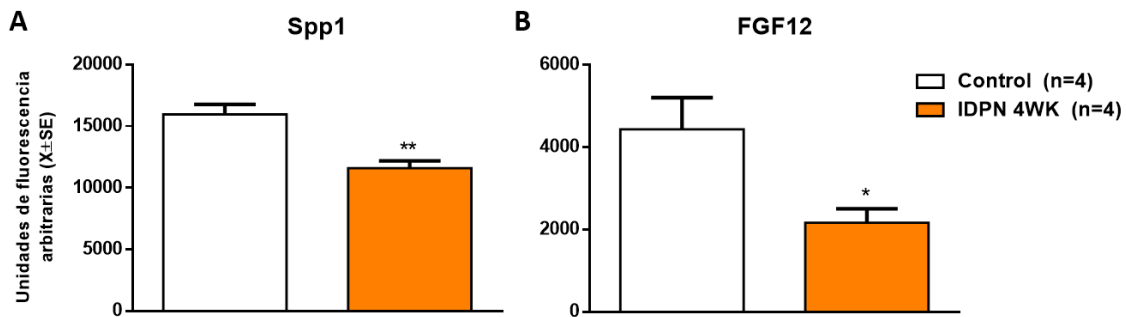


Figura R75. Efecto de la exposición crónica de IDPN a una concentración de 20mM durante 4 semanas en agua de bebida en las proteínas Spp1 (A) y FGF12 (B) en ganglio vestibular. Se cuantificó la fluorescencia total media de 30 células por animal en inmunofluorescencia. El grosor de cada imagen fue de 0.5 μm en un stack total de 25 μm . *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control después del análisis T-student. Spp1: $p = 0.005$ y FGF12: $p = 0.036$. Control: animales control, IDPN 4W: animales tratados con IDPN a una concentración de 20mM durante 4 semanas en agua de bebida.

5.8 Restablecimiento de la expresión génica de *Spp1*, *Etv5*, *Camk1g*, *Slc17a6* y *Nptx2* en ganglio en ratones tratados con IDPN a los que se les interrumpió el tratamiento

Para conocer más en profundidad los procesos moleculares relacionados con la expresión de los genes comúnmente expresados se seleccionaron cuatro cuyo nivel de expresión ha sido vinculado a la tasa de actividad neuronal. Estos fueron *Spp1*, *Camk1g*, *Slc17a6* (diferencialmente expresados en los tres modelos) y *Nptx2* (común en el modelo de IDPN de rata y ratón). Además de estos, también se estudió del favor de la transcripción *Etv5*, uno de los genes con mayor relevancia estadística en los estudios de RNA-seq de rata y ratón con IDPN, y que ha sido propuesto como un factor importante en la diferenciación terminal de las neuronas.

El objetivo de este experimento fue estudiar la recuperación en base a estos cinco genes en ratones expuestos de forma crónica a IDPN (siguiendo las mismas condiciones del primer RNA-seq) con una posterior interrupción del tratamiento de 10 semanas. Es importante señalar que estos ratones tuvieron una recuperación funcional completa después de la suspensión del tratamiento.

Para el análisis, se extrajo el ARN de ganglios de ratones control, expuestos a IDPN durante 8 semanas a una concentración de 30mM y recuperación. Se utilizó el ARN de 8 ratones por grupo para un análisis posterior por qRT-PCR.

La Figura R76 muestra la expresión de estos genes en los tres grupos experimentales. En consonancia con los datos de RNA-seq, se observa la disminución en la expresión de todos los genes con el tratamiento. En aquellos ratones a los que se les interrumpió la exposición presentaron signos de recuperación completa en los genes *Spp1*, *Camk1g* y *Nptx2*, parcial en *Etv5*, y unos niveles semejantes a los del grupo tratamiento en *Slc17a*.

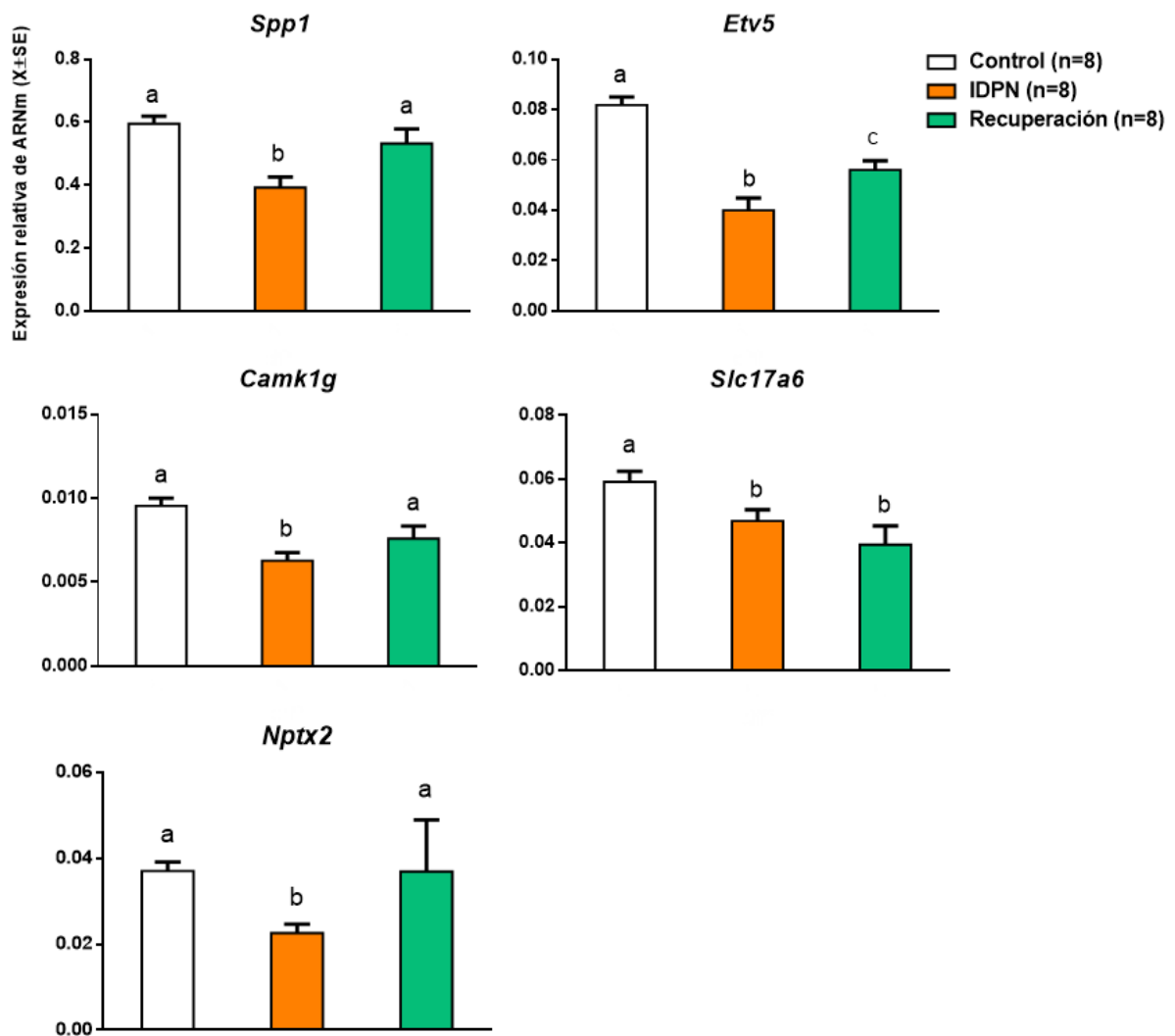


Figura R76. Recuperación en la expresión de ARN mensajero (ARNm) de los genes seleccionados en ganglios vestibulares de ratones macho 129S1 / SvImJ expuestos a IDPN. Se estudiaron los grupos control, IDPN (8 semanas de exposición a IDPN a una concentración de 30mM) y recuperación (8 semanas de exposición a IDPN con 10 semanas de recuperación) Se estudiaron 8 animales por grupo. Los genes demostraron una disminución en la expresión de ARNm después de la exposición a IDPN en los ganglios vestibulares, y todos ellos a excepción de *Slc17a6* mostraron signos de recuperación. Las letras encima del gráfico de barras indican qué condiciones son estadísticamente diferentes a partir de la prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa. *Spp1*: $F(2,21): 8.348 p = 0.002$; *Etv5*: $F(2,21): 28.293 p = 0.000$; *Camk1g*: $F(2,21): 8.154 p = 0.002$; *Slc17a6*: $F(2,21): 8.154 p = 0.002$; *Nptx2*: $F(2,21): 2.976 p = 0.082$. El gen utilizado como control endógeno fue *Gapdh*.

5.9 Estudio de la expresión génica de *Spp1*, *Etv5*, *Camk1g*, *Slc17a6* y *Nptx2* en ganglio de ratón con una pérdida completa de células ciliadas

Tanto en los dos modelos de IDPN como en el de estreptomycin existe una pérdida de adhesión entre las células ciliadas y las neuronas, ligado a su vez a la pérdida funcional. El análisis bioinformático de los estudios de RNA-seq en rata y ratón expuestos a IDPN revelaron una disminución en la actividad neuronal a causa de la ototoxicidad. La hipótesis que se planteó a continuación fue que, esta menor actividad podría estar relacionada con una menor estimulación de la neurona por parte de su eferente, a causa de la desconexión entre ambas.

Para probar la hipótesis, se estudió la expresión de *Spp1*, *Etv5*, *Camk1g*, *Slc17a6* y *Nptx2* en el modelo animal de eliminación de células ciliadas por exposición a alilnitrito en ratones (Boadas et al., 2009). En éste existe una pérdida total de células ciliadas a causa del daño ototóxico, por lo que, la neurona pierde por completo su interacción con su eferente. Además, el alilnitrito no causa toxicidad axonal (Soler-Martín et al., 2011).

Para este experimento se utilizaron un total de 20 ratones 129S1/SvlmJ adultos divididos equitativamente en dos grupos: control y expuestos de forma aguda a alilnitrito a una dosis de 1.2mmol/kg por intubación intragástrica. El vehículo en el que iba disuelto el nitrito fue aceite de maíz, y éste fue administrado a los ratones control.

Los ratones mostraron a los pocos días una pérdida considerable de peso, llegando a una pérdida del 12% en el día cuatro post administración (Figura R77A). En cuanto al comportamiento, los ratones presentaron una pérdida funcional prácticamente completa en la segunda semana después del tratamiento (Figura R77B).

La prueba MANOVA de medidas repetidas con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del peso corporal a lo largo del tiempo (F (1.488, 26.790): 7.549, p = 0.005), y sin significación estadística a causa del tratamiento (F (1, 18): 2.350, p = 0.143) ni en la interacción entre tiempo y tratamiento (F (1.488, 26.790): 2.513, p = 0.113).

La prueba MANOVA de medidas repetidas con la variable día como factor intra-sujetos y con la corrección de Greenhouse-Geisser determinó un efecto estadísticamente significativo en la media del ángulo mínimo a lo largo del tiempo (F (1.956, 35.201): 6.385, p = 0.005), a causa del tratamiento (F (1, 18): 54.751, p = 0.000) y en la interacción entre tiempo y tratamiento (F (1.956, 35.201): 15.046, p = 0.000).

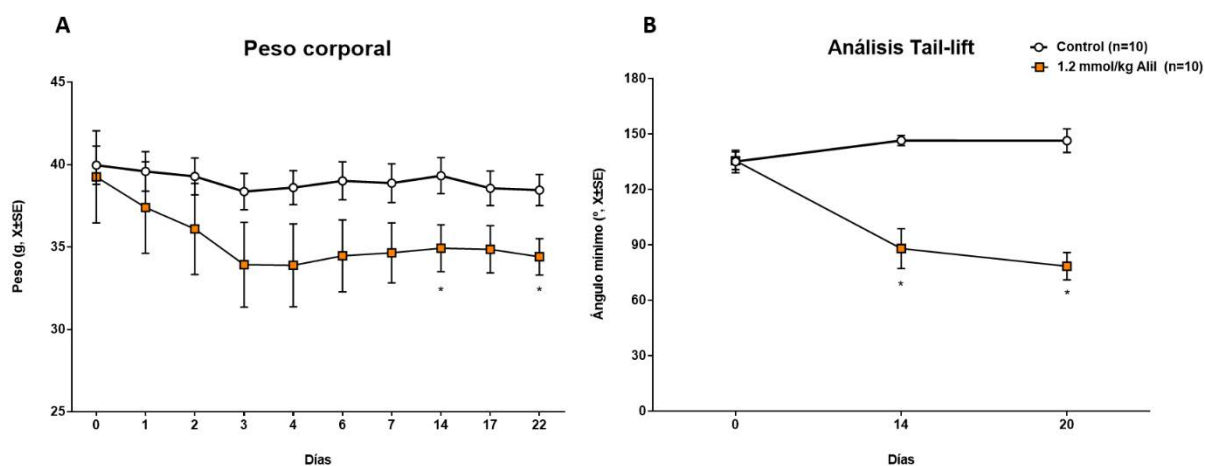


Figura R77. Efectos en el peso corporal (A) y en el ángulo mínimo del reflejo tail-lift (B) de la exposición aguda de alilnitrito a una dosis de 1.2mmol/kg. La gráfica muestra la media del peso corporal (A) y ángulo mínimo (B) (X ± SE) en ratones macho 129S1 / SvlmJ. *: p <0.05, significativamente diferente del grupo de control, prueba de Duncan después de una prueba ANOVA significativa.

Para estudiar la expresión génica se extrajo el ARN del ganglio vestibular de los ratones y se analizaron los genes seleccionados (*Spp1*, *Etv5*, *Camk1g*, *Slc17a6* y *Nptx2*) por qRT-PCR con *Gapdh* como control endógeno. La Figura R78 señala una disminución muy marcada en todos los genes estudiados con reducciones aproximadas del 62% en *Spp1*, 79% en *Etv5*, 81% en *Camk1g*, 30% en *Slc17a6* y 53% en *Nptx2* con relación al control.

Estos resultados respaldan la hipótesis de que la disminución en la expresión de estos genes en los modelos de intoxicación crónica se produce, al menos parcialmente, por la desconexión de la célula ciliada con la neurona.

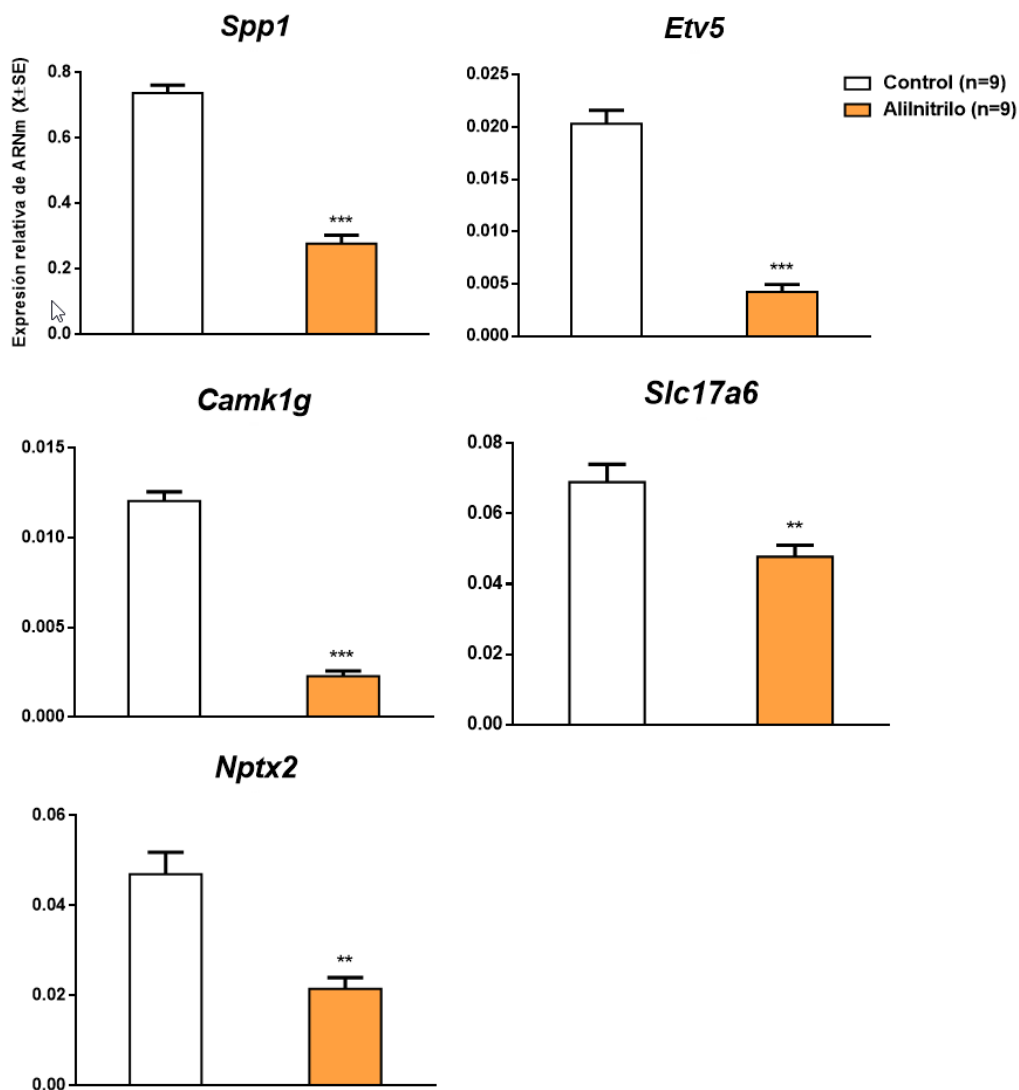


Figura R78. Alteraciones en la expresión de genes seleccionados en ganglios vestibulares de ratones macho 129S1 / SvImJ expuestos de forma aguda a alinitrilo a una dosis de 1.2mmol/kg por vía intragástrica. Los genes estudiados mostraron una disminución en la expresión de ARNm después de la exposición aguda a alinitrilo. Se analizaron dos grupos experimentales, Control: ratones a los que se les administró aceite de maíz y Alinitrilo: ratones a los que se les administró alinitrilo. Se utilizó *Gapdh* como control endógeno. *: $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de control después del análisis T-student. *Spp1*: $p = 0.000$, *Etv5*: $p = 0.000$, *Slc17a6*: $p = 0.004$, *Nptx2*: $p = 0.001$ y *Camk1g*: $p = 0.000$

DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: Relación entre la pérdida de células ciliadas y la alteración de dos reflejos anti gravitacionales en la rata

El sistema vestibular es estimulado por aceleraciones que varían mucho en frecuencia e intensidad. Estos estímulos se codifican para ser utilizados en una gran variedad de comportamientos reflejos y funciones de control motor, así como cognitivas. La identificación de la base celular de cada función vestibular contribuirá a la comprensión de las funciones biológicas de este sistema y con ello, a la capacidad para poder enfrentar los déficits y enfermedades vestibulares.

En este trabajo se ha utilizado un abordaje clínicamente relevante, la exposición a un compuesto ototóxico, para causar diversos grados de daño en el epitelio sensorial vestibular. A partir de aquí, se ha evaluado la relación entre el grado de la lesión y la pérdida funcional en dos reflejos vestibulares en la rata. Los resultados obtenidos dan apoyo adicional a las conclusiones de un estudio previo en el que se propuso que los reflejos tail-lift y air-right proporcionan una medida cuantitativa útil en la evaluación de la disfunción vestibular (Martins-Lopes et al., 2019). El tratamiento ototóxico también provocó la pérdida de peso corporal, pero es un efecto secundario transitorio y es poco probable que afecte a los reflejos evaluados.

Los recuentos de HCs se obtuvieron a partir de epitelios procesados por inmunohistoquímica con anticuerpos contra Caspr1 para identificar las HCI, calretinina para las HCII y Myo7a como identificativo de todas las células ciliadas.

Caspr1 no es un marcador de HCI, pero puede utilizarse para este propósito, ya que identifica la membrana postsináptica en la cara interna de los cálices (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011; Sedó-Cabezón et al., 2015). En estudios previos ha quedado reflejado que Caspr1 puede ser regulada negativamente de forma reversible durante la toxicidad crónica de IDPN (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). Sin embargo, la exposición aguda o subaguda a IDPN causa una degeneración irreversible de HCs (Llorens et al., 1994; Seoane et al., 2001a, b) y la estabilidad en la disfunción vestibular registrada coincide con una pérdida de HCs y no a una pérdida reversible de Caspr1. No obstante, en otros modelos de ototoxicidad se han descrito daños persistentes en el cáliz de las HCI (Hirvonen et al., 2005; Sultemeier y Hoffman, 2017). Aunque esto no fue documentado en el modelo de IDPN, durante los recuentos, cualquier HCI que quedase en el epitelio después de perder su cáliz Caspr1 + se ha contabilizado como HCs (Myo7a +), pero no como HCI ni como HCII.

Por otro lado, en rata, se ha documentado que la expresión de calretinina es del 5-10% en el total de HCI, del 20 - 40% en las HCII de la estriola y del 70 al 80% en las HCII de la periferia (Desai et al., 2005a, b). La variabilidad en la expresión de esta proteína puede haber causado la pérdida de algunas HCII durante la segmentación de las imágenes, provocando una reducción en el número estimado de las mismas. En consecuencia, este hecho explicaría, al menos parcialmente, las mayores proporciones HCI / HCII contabilizadas en los recuentos celulares en comparación con estudios anteriores (Desai et al., 2005 a, b). Por último, Myo7a es un marcador de HCs bien conocido y ampliamente utilizado (Pujol et al., 2014).

Con respecto al menor número HCs en comparación a la suma independiente de HCI y HCII en algunos recuentos en crestas y utrículos de animales Control e IDPN400, una probable explicación es la subestimación de las células Myo7a + por las dificultades técnicas para discernir las células en epitelios sin pérdida celular densamente poblados.

Debido a la resistencia innata de los roedores a los antibióticos aminoglucósidos, se utilizó el IDPN, un agente ototóxico experimental cuyos efectos en el sistema vestibular presentan

muchas similitudes con los de los aminoglucósidos. Entre ellas se incluye la afectación de las células ciliadas y la progresión del daño dependiente del epitelio y de la zona. A partir del trabajo pionero de Lindeman (1969), han surgido multitud de estudio, incluyendo algunos del laboratorio en el que se realizó la tesis (Llorens et al., 1993; Llorens y Demêmes, 1994), que afirman que las HCI son más sensibles a los ototóxicos que las HCII, y que la susceptibilidad del sistema vestibular progresa en un orden de cresta > utrículo > sáculo, y desde las zonas centrales a las periféricas. Sin embargo, sorprende el escaso número de estudios que han proporcionado una evaluación cuantitativa de ello (Lopez et al., 1997; Nakayama et al., 1996; Hirvonen et al., 2005).

En el presente estudio, los datos demostraron claramente la mayor susceptibilidad de las HCI en comparación con las HCII a la ototoxicidad por IDPN, y la mayor resistencia del sáculo al efecto ototóxico. Por el contrario, no se encontraron diferencias claras entre la susceptibilidad de la cresta y el utrículo, o entre las regiones centrales y periféricas. En cualquier caso, la mayor resistencia de las HCII y del sáculo al daño ototóxico probablemente esté relacionada con la susceptibilidad diferencial estudiada en el sistema auditivo. En la cóclea, las HCs internas son más resistentes que las externas a la toxicidad por aminoglucósidos y cisplatino, y la susceptibilidad disminuye progresivamente desde el extremo basal al apical, dando como resultado los déficits de audición a frecuencias altas. No se ha establecido la base precisa de estas diferencias, pero se cree que son el resultado de diferencias bioquímicas y fisiológicas intrínsecas entre las HCs (Lee et al., 2013; Fettiplace y Nam, 2019).

El incremento en la concentración de las dosis de IDPN provocó un daño más extenso y una pérdida funcional más profunda. Los datos permitieron elegir valores límite para las respuestas normales, según lo definido por el comportamiento de las ratas de control. También, la comparación de datos histológicos y de comportamiento permitió definir las respuestas correspondientes a la ausencia de función vestibular, por la pérdida prácticamente completa de células ciliadas en las ratas del grupo IDPN1000. Un resultado sorprendente, y a la vez limitante del estudio, fue la baja proporción de animales que mostraron una función vestibular intermedia entre los límites establecidos.

La transición entre las respuestas normales y totalmente afuncionales fue más marcada en el reflejo de tail-lift que en el de air-right, pero en ambos casos mermó la robustez de los análisis estadísticos posteriores. Para los dos reflejos, muchos animales mostraron una respuesta idéntica a la de las ratas IDPN1000, es decir, según lo establecido, aquella correspondiente a una ausencia de la función vestibular, pese a contener todavía una gran proporción de HCs. Un claro ejemplo de esto se puede observar en la población de HCII: los datos de la Figura R14 revelan que los ángulos de tail-lift disminuyen a dosis más bajas que en las dosis a las de los recuentos de HCII empiezan a bajar. Una posible explicación de esta observación es que las células restantes no son funcionales. Se han encontrado evidencias de células ciliadas supervivientes no funcionales en un modelo de chinchilla expuesta a gentamicina intratimpánica (Hirvonen et al., 2005). Por tanto, es posible que muchas o todas las células supervivientes contabilizadas en este estudio no sean funcionales para la transducción sensorial o la transmisión sináptica. Aunque esta hipótesis debe aún evaluarse en estudios futuros, los datos disponibles sugieren que las células supervivientes sí que son realmente funcionales.

En primer lugar, la relación entre el recuento de células y la evaluación funcional fue diferente para los dos reflejos, indicando que al menos alguna función restante sirve para uno, pero no para el otro. Segundo, aunque una pequeña proporción de las células supervivientes al tratamiento muestra daño en los estereocilios, la mayoría de ellas cuentan con estereocilios similares a los de control (Llorens et al., 1993; Llorens y Demêmes, 1994; Boadas-Vaello et al., 2017). En tercer lugar, la distribución normal del marcaje de Caspr1 en las uniones caliciales en

las células que estaban presentes, también sugiere una función normal, como lo indica la recuperación funcional asociada con el restablecimiento del marcaje por Caspr1 similar al control después de la exposición crónica a IDPN (Sedó-Cabezón et al., 2015). Únicamente se observó algún cáliz fragmentado en los sáculos de los tratamientos subagudos de tres días consecutivos. Para un estudio más exhaustivo, se repitió el análisis obviando estas células en el recuento, y no se obtuvo ningún cambio en el resultado general. Para concluir, el mantenimiento del número de puntos sinápticos en las HCII supervivientes similares al control (Figura R25) también apoyó la hipótesis de la funcionalidad de estas células.

Una explicación alternativa, y la que se plantea en esta tesis, es que las células ciliadas supervivientes siguen siendo funcionales, pero que estos reflejos dependen en gran medida de una población particular de células ciliadas vestibulares. Una de ellas se perdería con mayor facilidad a un nivel de toxicidad determinado, provocando una caída en la función refleja. Bajo esta hipótesis, los datos actuales proporcionan indicios sobre la base celular de los dos reflejos estudiados. Por ejemplo, la comparación de datos en las Figuras R13 y R14 sugiere que las HCI tiene un papel más importante que las HCII en el establecimiento del reflejo de tail-lift, ya que la pérdida de este reflejo parece ocurrir antes de que empiece la pérdida de HCII. Además, los datos de la figura R16 indican que las HCI en la cresta y el utrículo probablemente no tenga un papel importante en el reflejo de air-right. Esto es debido a que únicamente se registraron ligeros aumentos en los tiempos de air-right en los animales que mostraron una pérdida profunda de estas células, y los tiempos todavía mostraban aumentos dependientes de la dosis después de la pérdida completa de HCI.

En relación con este punto, hay que indicar que, en los tiempos evaluados, existió la interferencia por el contacto con una almohadilla de espuma en las ratas severamente deficientes en la función vestibular, y que no consiguieron enderezar su cabeza en el aire. Aun así, esto no invalida la observación de un enderezamiento casi normal asociado a una pérdida profunda de HCI en la cresta y el utrículo.

El papel preciso de las HCI y HCII en la función vestibular aún no se ha establecido por completo. Sin embargo, la mayoría de la evidencia disponible respalda la noción de que las unidades HCI / cáliz son receptores de adaptación rápida que se especializan en la transducción de estímulos de alta frecuencia. Estos responderían, según fuera necesario, para generar reflejos que impulsaran las acciones compensatorias rápidas ante la pérdida del equilibrio (Eatock, 2018). Las células ciliadas de tipo II, en cambio, tendrían un papel más tónico o sostenido como en el control de la postura corporal (Eatock, 2018).

Este trabajo ha utilizado la estrategia de estudiar el impacto de las lesiones vestibulares parciales en el comportamiento, para establecer así hipótesis sobre las funciones fisiológicas de los tipos de células ciliadas y los subsistemas vestibulares. Los futuros estudios que utilicen este enfoque podrán beneficiarse del conocimiento cada vez mayor de los subtipos de células y aferentes gracias a la expresión de proteínas únicas (McInturff et al., 2018; Hoffman et al., 2018), así como del uso de enfoques más complejos, como la manipulación genética (Ono et al., 2020), y la integración de registros aferentes (Hirvonen et al., 2005).

Otro aspecto que precisa de futuras investigaciones es la ampliación de los resultados a otras especies como el ratón. En vista a las características comunes y también las diferencias específicas entre especies a nivel de histología y fisiología vestibular (Boyle et al., 1992; Curthoys et al., 2017; Desai et al., 2005a, b; Eatock, 2018; Goldberg, 2000), sería prematuro extrapolar estos resultados a ratón. Por ejemplo, se ha descrito la curvatura ventral en ratones con afectación vestibular durante el levantamiento por la cola. Sin embargo, las observaciones en el laboratorio donde se realizó la tesis, tras toxicidad vestibular en ratas (Llorens et al., 1993;

Llorens y Rodríguez-Farré., 1997; Martins-Lopes et al., 2019; este estudio) y ratones (Soler-Martin et al., 2007; Saldaña-Ruíz et al., 2013; Boadas- Vaello et al., 2017; Greguske et al., 2019), sugieren que la función anormal del reflejo tail-lift se desarrolla de forma más fácil y robusta en rata que en ratón.

CAPÍTULO II: Efecto de la toxicidad crónica por estreptomicina en el sistema vestibular en rata

En los últimos años, el laboratorio en el que se ha realizado la tesis se ha centrado en estudiar el proceso degenerativo de los nitrilos en el sistema vestibular. Entre ellos, se destaca el IDPN (3,3'-iminodipropionitrilo) por su afectación a las células ciliadas (Llorens et al., 1993) y por su flexibilidad única con respecto a la dosis y forma de administración. Gracias a la sencillez a la hora de establecer modelos de toxicidad crónica y aguda, este compuesto ha permitido el estudio de las bases moleculares que hay detrás de cada uno de los procesos.

Se ha observado que los mecanismos degenerativos del IDPN en las células ciliadas es diferente en función de su modo de administración. En los modelos de exposición aguda a dosis altas el IDPN provoca la necrosis de las células ciliadas (Seoane et al., 2001a), y, en cambio, en modelos de exposición subagudos, las células siguen una muerte celular de tipo apoptótico. La pérdida funcional ocasionada en ambos procesos es irreversible debido a la limitada capacidad regenerativa del sistema vestibular en mamíferos (Forge et al., 1993, 1998; Golub et al., 2012; Tanyeri et al., 1995; Warchol et al., 1993).

Por otro lado, el modelo crónico por IDPN presenta una dinámica de lesión muy diferente a los anteriores, reflejando un aspecto muy interesante a nivel terapéutico, la capacidad de regeneración después del daño (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). Uno de los mecanismos moleculares más destacados en este tipo de lesión es la pérdida progresiva de las proteínas de adhesión entre la célula ciliada y su aferente, entre ellas Caspr1. El tratamiento promueve la fragmentación y progresiva desaparición de la unión calicial, la cual coincide con la pérdida funcional.

Además, la pérdida de Caspr1, promueve a su vez la deslocalización de KCNQ4, un canal que contribuye a la homeostasis del potasio en este tipo de sinapsis (Sousa et al., 2009). Con el tratamiento, KCNQ4 deja de estar contenido en la cara interna los cálices y se distribuye a lo largo de la membrana neuronal (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011; Sedó-Cabezón et al., 2015). Se ha demostrado en los modelos de IDPN en rata y ratón que ambos procesos son totalmente reversibles, si se interrumpe el tratamiento en este punto de la degeneración (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019).

Es necesario destacar que el IDPN es un compuesto experimental, por lo que, resulta necesario estudiar si estos mecanismos moleculares son propios del nitrilo, o, por el contrario, extrapolables a otros compuestos con relevancia clínica como los antibióticos aminoglucósidos.

Parte del trabajo de esta tesis se ha centrado en replicar estos hallazgos en un modelo alternativo con estreptomicina. Se ha elegido este aminoglucósido por ser predominantemente vestibulotóxico, y por su relevancia clínica en el tratamiento de la tuberculosis. Para el estudio, se ha partido del modelo animal de ototoxicidad crónica con estreptomicina propuesto en Granados y Meza. (2005). Siguiendo las instrucciones del modelo, se administró estreptomicina a ratas a partir del día 21 de su nacimiento, pero cambiando la vía de administración de intramuscular a subcutánea para reducir el sufrimiento animal.

Se utilizó como referencia la dosis de 400mg/kg de Granados y Meza. (2005), pero además de esta, también se probaron las dosis de 100, 300, 500 y 600 mg/kg como primera aproximación al estudio. La estreptomina fue administrada durante 6 o 8 semanas una vez al día, dependiendo del grupo experimental. Tal y como se ha comentado en el apartado de resultados, las dosis por debajo de 500mg/kg no provocaron una disfunción vestibular evidente y la de 600 mg/kg comprometió seriamente la supervivencia de los animales del estudio, resultado demasiado agresiva. En base a estos resultados, se seleccionó la dosis de 500mg/kg como referencia para la caracterización del modelo.

El tratamiento hizo que las ratas tratadas ganaran menos peso, siendo este hecho más pronunciado en machos que en hembras. En cuanto a la ototoxicidad, las ratas empezaron a mostrar los primeros signos de disfunción vestibular a las cuatro semanas de tratamiento, en concordancia con lo observado en Granados y Meza. (2005), y el efecto fue similar en machos y hembras. La equivalente afectación vestibular en ambos sexos presenta una ventaja sobre el modelo de IDPN en rata y ratón, donde su caracterización se realizó exclusivamente en machos debido a una afectación desigual entre sexos. A pesar del buen aspecto que mostraron las ratas del estudio, los minutos posteriores a la administración resultaban en un estado de letargia que se prolongaba hasta la media hora aproximadamente, debido posiblemente a la rápida absorción del antibiótico y a su conocida acción sobre los receptores colinérgicos (Amici et al., 2005). Este efecto no ha sido descrito en Granados y Meza. (2005), quizás por haber utilizado una menor concentración y una vía de administración en la que la absorción es más lenta.

Los dos tiempos de tratamiento establecidos (6 y 8 semanas) provocaron un grado de disfunción similar, y en ambos casos, a los animales a los que se les suspendió el tratamiento tuvieron una recuperación funcional completa. La estabilidad disfuncional entre los dos tiempos de tratamiento podría ser debido a un proceso de saturación en el acceso del antibiótico al oído interno, pero no se dispone de datos que apoyen esta u otras hipótesis.

A nivel ultraestructural los tejidos de las ratas tratadas y control mostraron una apariencia similar con evidentes signos de pérdida celular en las primeras. El menor número de células ciliadas no fue acompañado de signos de extrusión, apoptosis o necrosis, por lo que la forma de muerte celular resultó incierta. Es necesario remarcar que no se utilizaron procedimientos específicos como la técnica TUNEL para la detección de la fragmentación del ADN, y con ello, estudiar la apoptosis incipiente. Sin embargo, a nivel general las células mostraron una apariencia similar a los controles, sin aparentes signos de daño ni en el cuerpo celular ni en los estereocilios. En Granados y Meza. (2005) no se llegó a esta profundidad de análisis, pero se observaron por microscopía óptica algunas células ciliadas abandonado el tejido por extrusión de forma eventual.

Los resultados descritos en la tesis divergen de los argumentados en Li et al. (1995), donde, después del tratamiento repetido con gentamicina (durante 10 días), se observó en cobayas células ciliadas apoptóticas y en proceso de extrusión. Los resultados sugerían que ambos tipos de muerte celular ocurrían de forma simultánea después del tratamiento con aminoglucósidos. Posteriormente, Nakagawa et al. (1997), demostró que, incluso las células extruidas presentaban signos propios de la apoptosis. En el modelo de estreptomina, en cambio, no existen manifestaciones de apoptosis tan claras como los propuestos en estos artículos. Es necesario puntualizar que se han utilizado especies (cobaya y rata), tiempos de tratamiento y ototóxicos (gentamicina y estreptomina) diferentes. En esta tesis se plantea la hipótesis de que, la mayor susceptibilidad de las cobayas a los aminoglucósidos respecto a las ratas favoreció un daño más agudo en las células ciliadas, y con ello, la aparición de la apoptosis. En cambio, la exposición a tiempos más prolongados, y en una especie con una resistencia innata a estos

compuestos como es la rata, podría amortiguar el impacto del tratamiento, desencadenando procesos de muerte celular alternativos como la extrusión.

Con el objetivo de conocer más en profundidad la pérdida celular después del tratamiento con estreptomina, se procesaron los epitelios vestibulares por inmunohistoquímica para realiza el recuento de cada población de célula ciliada. En concordancia con los trabajos iniciados con Lindeman (1969), las HCI mostraron una mayor susceptibilidad al tratamiento que las HCII, manteniéndose los recuentos de estas últimas prácticamente invariables en todos los grupos experimentales. Por contra, los resultados obtenidos no coinciden con la progresión de la lesión en dirección de cresta> utrículo> sáculo, y desde las zonas centrales a las periféricas (Llorens et al., 1993; Llorens y Demêmes, 1994). En el modelo de estreptomina se cuantificó una pérdida similar de células ciliadas para los tres epitelios vestibulares, con disminuciones ligeramente mayores en utrículo que en crestas. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las zonas centrales y periféricas. Las divergencias observadas podrían ser debidas a que los estudios de sensibilidad previamente mencionados se realizaron con aminoglucósidos diferentes a la estreptomina, y, además, la vía de administración también fue diferente. Sin embargo, y en concordancia con los datos de IDPN presentados en la primera de la tesis, no se observaron grandes diferencias entre utrículo-cresta y tampoco entre las zonas periféricas-centrales.

A nivel molecular, y del mismo modo que en los modelos de IDPN, la estreptomina provocó la pérdida Caspr1 y la deslocalización de KCNQ4. Además, estos resultados, junto a la pérdida de electrodensidad en las regiones calicales en ultraestructura, sugieren que la desaparición progresiva de las proteínas de adhesión es un proceso común ante el efecto ototóxico de ambos compuestos.

En la misma dirección que los resultados del recuento celular, el efecto en la Caspr1 también fue similar para los tres epitelios sensoriales y para las zonas centrales y periféricas. Los resultados obtenidos en la cuantificación de fluorescencia reafirmaron también el grado de lesión equivalente en los tratamientos de 6 o 8 semanas. Y, en concordancia con los datos funcionales, las cuantificaciones reflejaron un restablecimiento completo de la fluorescencia en los animales recuperación. Curiosamente, en éstos hubo una pérdida del 30-60% de HCI en función del epitelio sensorial. Por lo que la recuperación funcional podría ir ligada al restablecimiento de la Caspr1, y la pérdida de un porcentaje de HCI podría ser compensada por la función de las otras células en el tejido.

Se ha demostrado que en el modelo de IDPN existe un desacoplamiento sináptico y que éste es una de las principales causas de la pérdida funcional (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). Para estudiar este proceso en el modelo de estreptomina, se procesaron crestas por inmunohistoquímica con el marcador presináptico Ribeye y postsináptico PSD95. Tal y como se observó en el modelo de IDPN, con estreptomina también existió un descenso en el recuento de ambos, indicando que el tratamiento estaba afectando la sinapsis. Es importante puntualizar que el análisis no diferenció por tipo celular, sino que se cuantificó de forma general el número de densidades pre y postsinápticas por célula ciliada. Debido a que en este modelo existe una pérdida asimétrica de HCI con respecto a HCII, una proporción desigual de densidades sinápticas entre ambos tipos celulares podría distorsionar los resultados obtenidos. Sin embargo, en la tesis doctoral de Lara Sedó Cabezón se demostraron unos números de Ribeye y PSD95 similares para HCI y HCII en ratas control. Por último, no se pudo estudiar las sinapsis de los animales recuperación por la ausencia de muestras disponibles, pero hubiera sido interesante valorar el estado de éstas.

El recopilatorio de los resultados obtenidos indica que la etapa inicial en la degeneración crónica por IDPN y estreptomycinina podría ser común, pero con determinadas divergencias, como la mayor pérdida de células ciliadas observada en este último. En el modelo de IDPN también existe una pérdida celular, pero cuando el tratamiento se prolonga a lo largo del tiempo, y ésta es por extrusión. En ese punto de la lesión, las células ciliadas abandonan el tejido, pero curiosamente, se mantienen cierto tiempo en la parte apical de la membrana, hecho que facilita su posterior observación y estudio. Por contra, en el modelo de estreptomycinina, la ausencia de signos de extrusión o apoptosis dificulta concluir el tipo de muerte celular.

En Seoane et al. (2001b), se demostró en IDPN que las exposiciones crónicas y prolongadas de menor intensidad favorecen la extrusión. Por lo que, con el objetivo de resolver la incógnita de la pérdida celular en el modelo de estreptomycinina, y a su vez favorecer la observación de extrusión, se planteó un nuevo modelo de dos administraciones diarias. El objetivo fue distribuir y espaciar las dosis para prolongar su efecto en el tiempo y a menor intensidad. Para ello, se estimó la concentración en base a los 500mg/kg de dosis efectiva del modelo anterior. Finalmente, los tratamientos fueron de 300, 350 y 400mg/kg por dosis, dos veces al día durante 6, 4 y 3 semanas respectivamente. Al disminuir la concentración de las administraciones las ratas toleraron mejor el tratamiento, y con ello, desapareció la letargia post administración. Sin embargo, el tratamiento tuvo a largo plazo un mayor efecto en el peso corporal y una más temprana y profunda lesión vestibular.

La afectación funcional volvió a ser similar en ambos sexos y a las dos semanas ya había una disfunción vestibular incipiente, en el grupo de 300mg/kg, y severa en los otros dos grupos experimentales. Las ratas expuestas a 300mg/kg mostraron una progresión muy similar a las tratadas con IDPN 20mM en agua de bebida. En estas últimas, existe una extrusión generalizada a partir de la sexta semanas de tratamiento (Sedó-Cabezón et al, 2015), por lo que, con el fin de replicar el curso temporal de la extrusión por IDPN, se mantuvo el tratamiento de estreptomycinina durante ese mismo tiempo.

Para estudiar la recuperación en este segundo modelo de estreptomycinina, se suspendió el tratamiento a las tres semanas a una rata de cada sexo de los grupos de 350 y 400mg/kg. Y tal y como se observó en el modelo anterior, la recuperación funcional de las ratas de ambos grupos fue prácticamente completa.

Los estudios de inmunohistoquímica en los tejidos, y en concordancia con los registros funcionales, revelaron una mayor pérdida de células ciliadas y de la proteína Caspr1 en este segundo modelo que en el de una inyección diaria, indicando un estadio más avanzado en la degeneración. Los recuentos de HCl en este caso se realizaron con Spp1 debido a la gran desaparición de Caspr1. De nuevo, la población de HCII se mantuvo invariable por el tratamiento. Los resultados sugieren que, al haber administrado una concentración diaria significativamente mayor, los efectos en las ratas también lo fueron, a pesar de haber distribuido la dosis en dos administraciones.

Sorprendentemente, en los animales recuperación no se encontraron signos de restablecimiento en la Caspr1 en cresta y limitados en utrículo y sáculo. Estos resultados divergen de la recuperación funcional prácticamente completa observada. Sin embargo, al analizar en profundidad las HCl de estos animales, se apreció que la mayoría de ellas tenían el cáliz intacto a pesar de la baja intensidad en la fluorescencia. Los resultados sugieren que las células, a pesar de tener una menor cantidad de Caspr1, podrían ser totalmente funcionales al conservar por completo su unión calicial. Además, de los cuatro animales en recuperación, solo uno de ellos obtuvo un ángulo de tail-lift por debajo de 130 (112.15), y en éste se contabilizaron un menor número de HCl con el cáliz intacto (43.8 respecto a la media de 68.8).

Resulta sorprendente la recuperación del reflejo tail-lift en unos animales en los que existe una pérdida aproximada del 70% de las células ciliadas de tipo I en la cresta. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los datos de la primera parte de la tesis con IDPN, donde se observaban ángulos por encima de 120 grados en animales con una pérdida celular similar. En conjunto, los datos sugieren que las HCI más sensibles pueden tener una menor importancia para el reflejo, hipótesis a evaluar en estudios posteriores.

De forma simultánea a los análisis moleculares previamente descritos, también se abordó el estudio de la extrusión. Al igual que en el modelo anterior, los recuentos celulares reflejaron una importante pérdida de células ciliadas de tipo I. Sin embargo, en este sí que fue posible observar circunstancialmente células en extrusión o totalmente extruidas en utrículos de animales de los grupos de 300 y 350mg/kg. La ausencia de células en extrusión en el grupo de 400mg/kg suscita que el proceso de eliminación celular sucedió en un espacio temporal previo a la observación. El hecho de haber observado extrusión únicamente en utrículos hace referencia a la sensibilidad diferencial de los epitelio vestibulares al daño ototóxico, donde en este segundo modelo sí que pareció existir una mayor resistencia en utrículos y sáculos respecto a crestas. En Granados y Meza. (2005), las imágenes de extrusión publicadas también corresponden únicamente a utrículos, sin embargo, en el artículo no se hace referencia si fue en el único epitelio sensorial donde se observaron.

A nivel ultraestructural y, en concordancia con el modelo anterior, también se vio una marcada pérdida en la electrodensidad de las uniones entre la célula ciliada y la neurona, acompañado de una retracción en los cálices. Al igual que en microscopía confocal, también fue posible observar células extruidas o con partes del citoplasma en protrusión hacia el exterior de la membrana. Ambos resultados, junto a la ausencia de signos de apoptosis o daño celular, indican que la extrusión podría ser el mecanismo principal de pérdida celular en este modelo. Tal y como se comentó anteriormente, los resultados difieren de los publicados en Li et al. (1995), donde se publicaron imágenes de células apoptóticas en un elevado estado de degeneración. Paralelamente, los resultados también difieren de los observados en el modelo crónico de IDPN (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). En este último, la observación de multitud de células en extrusión sólo se explica si la mayoría de las células llegan a este estado de forma sincrónica, y además permanecen cierto tiempo adheridas a la zona apical de la membrana. Los resultados de estreptomycin, en cambio, sugieren que, en este modelo el proceso de extrusión debe ser mucho más rápido. La hipótesis que se plantea es que las células ciliadas pasan de forma individual por un estado de extrusión, y posteriormente abandonan el tejido, de una forma mucho más rápida y asíncrona, y por tanto más difícil de estudiar que la observada en IDPN.

Además, en vista a la gran pérdida de células ciliadas en este segundo modelo, los resultados indican que las concentraciones y tiempos utilizados podrían haber sido demasiado elevados para un estudio óptimo de la extrusión. En un futuro sería interesante reducir las concentraciones de cada dosis o bien acortar los tiempos de tratamiento.

CAPÍTULO III: Estudio de las uniones caliciales en muestras de pacientes con schwannoma vestibular

El schwannoma vestibular es un tumor que se desarrolla sobre el nervio vestibular a partir de células de Schwann. Dilwali et al. (2015), demuestran que este tipo de tumores segregan una serie de factores inflamatorios, entre ellos TNF- α capaces de dañar el oído interno. El laboratorio

donde se realizó la tesis colaboró con un equipo de cirujanos del servicio de otorrinolaringología del Hospital Germans Trias i Pujol, que realizan extirpaciones de este tipo de tumores de una forma que permite la recogida de los epitelios vestibulares para su estudio.

La colaboración posibilitó el estudio de muestras vestibulares humanas en un modelo degenerativo muy diferente al estudiado anteriormente con agentes ototóxicos. Los tejidos presentaron diferencias anatómicas importantes en cuanto a dimensiones y grosor respecto a los estudiados en rata, dificultando su procesamiento y observación. La aproximación adoptada para su estudio fue mediante inmunohistoquímica con los anticuerpos Myo7a y calretinina para la identificación de las células ciliadas, junto a Caspr1 para el estudio de los cálices. Los tres anticuerpos mostraron una buena especificidad de unión y el patrón de expresión observado en cada uno de ellos fue similar a los vistos en rata y ratón.

Sorprendentemente, fue posible observar cálices fragmentados y HCI que habían perdido por completo el marcaje de Caspr1 en un tercio de las muestras de pacientes con disfunción vestibular diagnosticada. Posteriormente, se realizó la reconstrucción 3D de algunos cálices fragmentados, y la pérdida de Caspr1 se manifestó por zonas, tal y como se había estudiado anteriormente en los modelos animales de ototoxicidad.

La existencia de uniones calicales desmanteladas en epitelios vestibulares humanos expuestos a la acción lesiva de un schwannoma vestibular, con apariencia similar al efecto de la exposición crónica a IDPN o estreptomina en roedores, sugiere que este proceso podría ser una respuesta general de la célula ciliada vestibular de los mamíferos al estrés crónico.

CAPÍTULOS IV Y V: Estudio del transcriptoma de los modelos de IDPN y estreptomina en epitelio y ganglio

El sistema vestibular es muy pequeño, hecho que limita las técnicas disponibles para el análisis de muestras. En el estudio de expresión génica existe la misma limitación, la cantidad de ARN que se puede extraer de cada una de las muestra es muy limitada. En el laboratorio donde se ha realizado la tesis se empezó utilizando la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de expresión génica, pero el número de genes que se analizaban por cada animal era tan escaso que fue necesario buscar opciones de mayor eficiencia.

El avance en la secuenciación masiva (NGS) permite hoy en día que los laboratorios puedan realizar estudios de este tipo, como el RNA-seq, a un precio asequible. En éste, se compara el número de copias de cada secuencia de ARN entre diferentes muestras biológica en un momento determinado (Chu y Corey, 2012; Wang et al., 2019). Con la técnica se obtiene un análisis detallado de los cambios transcriptómicos entre las distintas condiciones experimentales mediante la única inclusión de tres animales por grupo. Esto supone una revolución en el estudio del sistema vestibular, permitiendo obtener una cantidad muy grande de información con bajo número de muestras.

En esta tesis se han realizado dos estudios transcriptómicos en cada uno de los dos modelos estudiados: exposición crónica de IDPN y estreptomina (una dosis diaria) en rata. Los resultados obtenidos se unen a los equivalentes realizados con IDPN en ratón durante el transcurso de la tesis doctoral de Erin Greguske. Como se ha comentado, en cada modelo se realizaron dos aproximaciones distintas: epitelio y ganglio, por los posibles mecanismos de degeneración independientes en la célula ciliada y la neurona. Este enfoque permite una

reconstrucción global más clara y precisa del proceso ototóxico por el tratamiento. Es importante indicar que no se tuvieron en cuenta los sáculos en los estudios de epitelio. El difícil acceso del sáculo durante la disección, junto con la rapidez de extracción precisada para evitar los procesos degenerativos ajenos a la ototoxicidad, propiciaron la omisión del sáculo en los análisis. Además, la progresión de las alteraciones del epitelio vestibular es más lenta en el sáculo que en crestas y utrículos, por lo que también se omitió el sáculo para reducir la variabilidad experimental.

En los resultados de epitelio, los modelos de IDPN en rata y ratón mostraron gran coherencia en los datos, y una proporción importante de los genes diferencialmente expresados fueron comunes en ambos modelos. Del mismo modo, el análisis funcional posterior reforzó los resultados previos de desunión celular, mostrando la afectación de vías moleculares relacionadas con la adhesión célula-célula (con multitud de genes codificantes de cadherinas y proto cadherinas disminuidos). El hecho de haber encontrado grandes similitudes en ambos modelos de IDPN, tratándose además de especies diferentes, refuerza los hallazgos en ambos modelos y sugiere que algunos podrían coincidir con patrones generales de respuesta al daño ototóxico.

Los resultados de IDPN en ambas especies también revelaron un incremento en numerosos componentes de la vía de señalización por interferón JAK-STAT (Stat1, Stat2, Irf9, Irf7 e Irf2) y genes estimulados por ésta (Interferon-Stimulated Genes o ISGs), sugiriendo una activación de la respuesta inmunológica. Ya que los animales del estudio se encontraban en un entorno aséptico, la activación alternativa de estos grupos de genes puede deberse al estrés oxidativo e inflamación desencadenado por la propia exposición al ototóxico. Se ha documentado que la presencia de patrones asociados al daño (DAMPs) o señales de peligro pueden inducir este tipo de respuestas mediante la activación de determinados Toll-Like Receptors como el Tlr8, en conjunción con Myd88 (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016), u otros receptores citosólicos. Éstos reaccionan al ARN tanto viral como propio, y entre ellos se encuentran RIG-I, en conjunción con Trim25, Mda5 y Igp2 (Loo y Gale, 2011). El incremento en la expresión de todos los mencionados parece indicar que la activación de la vía podría darse al menos parcialmente a partir de estos mecanismos moleculares.

Por otro lado, el estudio del modelo de estreptomycinina mostró menos similitudes con los de IDPN, revelando mecanismos moleculares alternativos al daño ototóxico. A pesar de que en este no se encontró una disminución clara en cadherinas o proto cadherinas, sí que se vieron disminuidos algunos genes relacionados con las uniones GAP de las sinapsis como *Tubb3*, *Gnas*, *Kras*, *Gnai1*. Los análisis revelaron también una menor actividad metabólica, con la disminución de genes relacionados con la glicólisis, metabolismo de la galactosa, metabolismo del nitrógeno o biosíntesis de aminoácidos. Curiosamente, los resultados sugirieron un incremento en la actividad de la célula ciliada en relación con la sinapsis, con una mayor expresión de genes relacionados con sinapsis glutamatérgicas o señalización por neurotrofinas, posiblemente a modo compensatorio por el daño.

Se encontraron 67 genes comunes diferencialmente expresados en los tres modelos de epitelio, la mayoría de ellos (59) con un patrón de incremento o decremento común. Éstos resultan de gran interés por su posible relación con las respuestas al daño más básicas y fundamentales en las células ciliadas. Es importante remarcar que en el modelo de estreptomycinina se incluyó una hembra en el análisis, a diferencia del uso exclusivo de machos en los modelos IDPN, pudiendo contribuir a las divergencias observadas.

En base al estudio de los genes comunes, se estudió *Spp1*, expresada en el citoplasma de las células ciliadas de tipo I (McInturff et al., 2018) y disminuida en los tres modelos. Los datos de

inmunohistoquímica, en concordancia con los de RNA-seq, revelaron una disminución de la proteína en epitelio a causa del tratamiento con ambos compuestos. Recientemente se la ha relacionado con procesos inflamatorios en el oído interno (Zhang et al., 2018), por lo que su decremento podría actuar equilibrando el estado inflamatorio reflejado en los análisis. Todavía no está claro qué tipo de efecto puede tener en el sistema vestibular, pero a nivel celular, *Spp1* tiene propiedades proadhesivas y quimiotácticas, por lo que su disminución podría estar ligada a la pérdida de adhesión observada. También se le ha relacionado con una serie de eventos patológicos que incluyen inflamación, estrés oxidativo (Chakraborty et al., 2006; El-Tanani et al., 2006; Pagano y Haurani, 2006) y neurodegeneración ((Maetzler et al., 2007; Wung et al., 2007), procesos que concuerdan con el efecto esperado en ambos ototóxicos.

Calb2 fue otro de los genes diferencialmente expresado en ambos modelos de IDPN y en la que se cuantificó una disminución proteica en el modelo de dos administraciones diarias de estreptomycin. Calretinina es una proteína ampliamente utilizada como marcador de HCII y de subpoblaciones neuronales en el sistema nervioso central y en el ganglio vestibular (DeFelipe, 1997; Kvetter, 2002; Leonard y Kvetter, 2002). Se ha descrito que una de sus funciones en el oído interno es la de controlar la concentración de los iones de calcio, los cuales son clave en la señalización celular (Pangršič et al., 2015). Su menor expresión sugiere la desregulación en la respuesta de las células ciliadas o neuronas, que podría conducir a una pérdida funcional.

En la segunda parte de los análisis, en ganglio, y en concordancia con los datos de epitelio, también se encontró un porcentaje elevado de genes comunes diferencialmente expresados en los dos modelos de IDPN. El análisis funcional en ambos reveló una menor expresión de genes cuyo nivel de expresión depende de la actividad neuronal, como *Camk1g*, *Slc17a6* y *Nptx2*. Los resultados también indicaron una disminución en los procesos moleculares relacionados con el ciclo de las vesículas sinápticas, sugiriendo menor actividad de las neuronas vestibulares a causa del tratamiento.

Asimismo, en los dos modelos de IDPN, apareció disminuido, en las posiciones más altas de significación estadística, el factor de transcripción *Etv5*, del que se ha documentado su importancia en la diferenciación terminal de las neuronas. En Ebeid y Huh. (2020), se demostró que *Etv5* se activa durante la señalización de FGF9 para la regulación de la longitud coclear. Éste último se expresa en el epitelio de la vesícula ótica y se une al receptor FGFR1 de las células mesenquimales para promover la proliferación de células madre neurales, y con ello, contribuir al crecimiento coclear (Huh et al., 2015). Todavía no se ha estudiado la implicación de estos genes en el sistema vestibular, pero todos ellos aparecen disminuidos en los modelos de IDPN, sugiriendo una inhibición de la vía por el tratamiento.

Por otro lado, los datos de IDPN en ganglio reforzaron la hipótesis de la activación de la respuesta inflamatoria, y apoyaron la hipótesis de separación entre la neurona y célula ciliada, a través de una menor expresión de ARN mensajeros relacionadas con la adhesión focal.

En la misma dirección, los datos de estreptomycin reflejaron una pérdida de adhesión entre la neurona y la célula ciliada, y, además, apareció reflejado el estrés oxidativo provocado por el antibiótico, con el incremento de 54 genes de respuesta asociados.

Tal y como ocurrió en epitelio, al añadir los datos de estreptomycin al análisis comparativo, el nivel de concordancia bajó considerablemente. Aun y así, se encontraron un total de 104 genes comunes diferencialmente expresados, aunque la mayoría de ellos con un patrón de incremento o decremento diferencial. El estudio comparativo de los modelos de epitelio y ganglio reveló que el IDPN y la estreptomycin estimulan mecanismos ototóxicos distintos con determinados puntos en común, que podrían coincidir con el patrón de respuesta primario de las células

ciliadas y neuronas vestibulares al estrés crónico.

Uno de los genes comunes en los tres modelos en ganglio fue *FGF12*, un factor de crecimiento fibroblástico cuyos niveles de proteína también se vieron reducidos a causa del tratamiento con ambos compuestos. El papel de este factor en sistema auditivo y vestibular ha sido estudiado recientemente (Hanada et al, 2018). En este artículo se generaron ratones knock-out para *FGF12* mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Los resultados mostraron que, a nivel morfológico, el oído interno de estos ratones no era significativamente diferente en comparación con los ratones de tipo salvaje. Sin embargo, exhibían un umbral de audición aumentado, valorado por la respuesta auditiva del tronco encefálico, así como déficits en el equilibrio y en la prueba rotarod. En consecuencia, el estudio reveló la importancia de esta proteína en la correcta funcionalidad de ambos sistemas.

El análisis transcriptómico de ganglio también reveló el efecto de ambos compuestos en la expresión de *Spp1* y *Calb2*. En *Spp1* existió un decremento en la expresión génica en los tres modelos en ganglio y epitelio, y los resultados de inmunohistoquímica posteriores confirmaron un descenso de la proteína en ganglios de las ratas tratadas por IDPN. En el caso de *Calb2*, los estudios de RNA-seq revelaron una menor expresión del gen en el modelo de estreptomina en ganglio y en ambos modelos de IDPN en epitelio. Los posteriores análisis cuantitativos de fluorescencia confirmaron una menor cantidad de proteína en ganglios de ratas expuestas a estreptomina.

En esta tesis se ha hecho hincapié en la menor actividad neuronal reflejada por el tratamiento, ya que podría suponer una pieza clave en la comprensión de la pérdida funcional observada. Los genes relacionados con este proceso fueron *Spp1*, *Camk1g*, *Slc17a* (diferencialmente expresados en los tres modelos) y *Nptx2* (común en el modelo de IDPN de rata y ratón). Se ha documentado que la expresión de estos genes está modulada positivamente por la actividad neuronal. Además, también se estudió el factor de transcripción *Etv5*, uno de los de mayor relevancia estadística en los estudios de RNA-seq de rata y ratón con IDPN, y con una posible relación en el proceso regenerativo.

Camk1g tiene un papel importante en la regulación neuronal dependiente del crecimiento, así como en la dendritogénesis neuronal (Wayman et al., 2006; Takemoto-Kimura et al., 2007). *Nptx2* desempeña un papel importante en el transporte de neurotransmisores y en el mantenimiento de la plasticidad sináptica (Kimoto et al., 2015; Lee et al., 2017). Por último, *Slc17a6* es un gen que codifica para el transporte vesicular de glutamato *Vglut2*. Esta proteína se expresa en neuronas glutamatérgicas, como es el caso de las neuronas vestibulares, y su labor es esencial para una función sináptica normal (Takamori et al., 2001).

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de estos genes en situaciones de ganancia y pérdida funcional, se estudiaron sus niveles de expresión génica mediante qRT-PCR en ratones control, tratados y en aquellos que habían recuperado por completo la capacidad vestibular después del tratamiento por IDPN. En concordancia con los resultados de RNA-seq, la expresión de todos ellos disminuyó a causa del tratamiento. En los ratones recuperación, en cambio, hubo un restablecimiento de *Spp1*, *Camk1g* y *Nptx2*, parcial para *Etv5*, e incompleta para *Slc17a*.

En los tres modelos, la pérdida de adhesión entre la célula ciliada y la neurona coincide con la aparición de disfuncionalidad vestibular. Los datos sugieren que la falta de interacción entre ambos tipos celulares podría estar propiciando, al menos parcialmente, la menor actividad neuronal, provocando a su vez los cambios de expresión detectados en los datos de RNA-seq. Para sustentar esta hipótesis se estudió *Spp1*, *Camk1g*, *Slc17a6*, *Nptx2* y *Etv5* en el modelo animal de eliminación de células ciliadas por exposición a alilnitrito en ratones (Boadas et al.,

2009). La pérdida total de células ciliadas que provocan estas condiciones de tratamiento hace que sea un modelo idóneo para estudiar si la carencia de células ciliadas tiene un efecto sobre la expresión de estos genes en las neuronas vestibulares. Como en el caso anterior, se realizó un estudio de qRT-PCR en ganglios vestibulares carentes de su aferente. En consonancia con hipótesis establecida, los resultados revelaron una disminución pronunciada de los genes seleccionados. Los resultados sugieren que la neurona precisa del contacto estrecho con la célula ciliada para mantener su actividad funcional, y una de las respuestas más básicas de ambos tipos celulares ante el estrés crónico, es precisamente su separación.

Los estudios realizados con posterioridad a la obtención de los datos de RNA-seq suponen solo el inicio de la extensa tarea que resta hasta extraer conclusiones de la gran cantidad información que éstos han proporcionado. La realización de los estudios transcriptómicos ha otorgado al laboratorio una valiosa hoja de ruta hacia la investigación de los mecanismos moleculares que intervienen en la respuesta de las células ciliadas al estrés crónico.

CAPÍTULO FINAL: Discusión general de la tesis

Los resultados expuestos en esta tesis han permitido el estudio de ambas poblaciones de células ciliadas desde un punto de vista funcional. Las evaluaciones a partir de los dos reflejos anti gravitacionales utilizados sugieren que, en ellos, intervienen capacidades diferentes, con una mayor o menor participación de las HCI y HCII.

Por otro lado, se ha realizado un análisis cuantitativo completo sobre la sensibilidad diferencial de ambas poblaciones al tratamiento ototóxico con IDPN y estreptomina. Las HCII han mostrado una mayor resistencia al tratamiento con ambos compuestos, manteniéndose sus números prácticamente invariables en muchas de las condiciones experimentales estudiadas.

En esta tesis se han encontrado variaciones respecto a la progresión del daño vestibular propuesto de cresta>utrículo>sáculo, y desde las zonas centrales a las periféricas (Llorens et al., 1993; Llorens y Demêmes, 1994). En los resultados obtenidos no hubo diferencias significativas entre la susceptibilidad de la cresta y el utrículo, o entre las regiones centrales y periféricas. El sáculo demostró una mayor resistencia al tratamiento ototóxico, aunque sus niveles de Caspr1 después del tratamiento con estreptomina fueron similares al de la cresta y el utrículo.

Por otro lado, el modelo de una inyección diaria de estreptomina replicó los procesos iniciales documentados en la degeneración crónica por IDPN. Éstos se caracterizaron por la desaparición progresiva de las proteínas de adhesión en la región calicial, deslocalización de KCNQ4 y desacoplamiento sináptico. Además, el desmantelamiento de las uniones caliciales también a causa del neurinoma parece indicar que podría tratarse de un proceso general en la célula ciliada vestibular de los mamíferos ante el estrés crónico.

En esta tesis se consiguió observar el proceso de extrusión en el modelo de dos inyecciones diarias de estreptomina, al igual que en la ototoxicidad tardía por IDPN, pero de una forma menos uniforme, generalizada y sincrónica. Además, la ausencia de signos de apoptosis o daño celular, junto a la pérdida en la electrodensidad de las uniones entre la célula ciliada y la neurona, sugieren que la extrusión podría ser el mecanismo principal de pérdida celular.

En los dos modelos de estreptomina estudiados se observó una recuperación funcional completa al suspender el tratamiento. Con el IDPN también existe una recuperación completa

en los estadios iniciales, sin embargo, si se alarga la exposición en el punto donde empieza la extrusión, ya no es posible observarla. Esto es debido a que el proceso de extrusión es irreversible y las células extruidas no son funcionales. Sin embargo, en el caso de la estreptomina, al ocurrir este proceso de forma individual, el resto de las células serían las responsables de la ganancia de función al interrumpir el tratamiento.

Los datos de RNA-seq en los modelos de rata y ratón por IDPN mostraron gran coherencia tanto en ganglio como en epitelio a pesar de tratarse de dos especies diferentes. Este hecho otorga robustez a los hallazgos en ambos modelos, y sugiere que algunos de ellos podrían coincidir con patrones generales de respuesta al daño ototóxico. De entre los genes diferencialmente expresados en ambas especies se encontraron un gran número de ellos relacionados con la adhesión celular tanto en ganglio como en epitelio. Además, los resultados evidenciaron una activación en la vía de señalización por interferón, posiblemente activada por la aparición de DAMPs.

Al realizar un estudio comparativo de los tres modelos, el grado de similitud bajó considerablemente, revelando la existencia de mecanismos moleculares diferentes ante la exposición de ambos compuestos. Aún y así, hubo una pequeña proporción de genes comunes de gran interés por su posible relación con las respuestas al daño más básicas y fundamentales en las células ciliadas. De entre ellos, se destacó *Calb2*, *Spp1* y *FGF12*, genes en los que se ha documentado su papel en el mantenimiento de la función y la homeostasis del oído interno.

Los datos de RNA-seq revelaron una disminución en genes relacionados con la actividad neuronal. Para estudiar este proceso, se seleccionaron y evaluaron una serie de ellos en ratones que habían recuperado en su totalidad la función vestibular después del tratamiento por IDPN. Los genes seleccionados mostraron un restablecimiento completo, parcial o ausente en el caso del caso del transporte vesicular de glutamato *Vglut2*. Sin embargo, todos ellos mostraron una disminución de expresión cuando fueron evaluados en el modelo animal de eliminación de las células ciliadas por alilnitrito. Por lo que, los datos sugieren que la hipofunción neuronal podría deberse, al menos parcialmente, a la pérdida en su contacto con la célula ciliada.

Gracias a los resultados y conclusiones obtenidos en esta tesis, los hallazgos previos en el modelo de IDPN han ganado robustez, y algunos de ellos, una mayor validez clínica al ser comunes con la ototoxicidad de la estreptomina. Además, los estudios transcriptómicos realizados ayudarán al laboratorio en el estudio de los procesos moleculares básicos en la degeneración de las células ciliadas, como es el caso del dismantelamiento de los cálices. Por último, esta tesis ha contribuido a una mayor comprensión del comportamiento y función de los dos tipos de células ciliadas del sistema vestibular: HCI y HCII.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis han llevado a las siguientes conclusiones:

1. Las HCI muestran una mayor sensibilidad que las HCII al tratamiento con los ototóxicos IDPN y estreptomina.
2. En ambos reflejos, tail-lift y air-right, existe una afectación dosis dependiente, pero el reflejo tail-lift se muestra más sensible al daño ototóxico, sugiriendo que los reflejos dependen de forma diferencial de ambas poblaciones de células ciliadas.
3. La afectación del reflejo de tail-lift se asocia mejor con la pérdida de HCI que con la de HCII, sugiriendo que puede depender predominantemente de la función de este tipo celular. Por el contrario, la mayor parte de HCI en la cresta y utrículo se pierden antes de que aumenten los tiempos de air-right, indicando una menor implicación de este tipo celular en el reflejo.
4. La administración subcutánea de estreptomina durante seis semanas a una dosis de 500 mg/kg provoca un estado de disfunción vestibular en ratas. Éste es reversible y no progresa si se alarga el tratamiento a ocho semanas.
5. La ototoxicidad crónica por estreptomina replica el proceso degenerativo inicial observado en el modelo de IDPN y caracterizado por la pérdida de las moléculas de adhesión Caspr1. Ello va acompañado de un desacople sináptico, con la disminución de componentes presinápticos y postsinápticos. Si se proporciona un periodo de recuperación a las ratas, existe una reparación de los cálices dañados asociado a una recuperación funcional.
6. En el modelo de una inyección diaria, la estreptomina causa la pérdida de células ciliadas por un proceso no identificado, ya que la observación de apoptosis o extrusión ha sido anecdótica.
7. La administración subcutánea de estreptomina dos veces al día a dosis de 300, 350 y 400mg/kg produce una afectación vestibular más temprana y profunda que la de una dosis diaria a 500mg/kg. Ello está asociado a la pérdida de HCI, que al menos parcialmente se produce por extrusión. Si se interrumpe el tratamiento, se produce una recuperación funcional y restablecimiento incompleto de Caspr1. El conjunto de observaciones sugiere que la extrusión podría ser una de las principales formas de muerte celular en este modelo.
8. La acción lesiva del schwannoma vestibular puede provocar la fragmentación de las uniones caliciales en epitelios vestibulares humanos. La similitud con el efecto de la exposición crónica a IDPN o estreptomina en roedores sugiere que este proceso podría ser una respuesta general de la célula ciliada vestibular de los mamíferos al estrés crónico.

9. Los estudios de transcriptómica indican un número importante de genes comunes diferencialmente expresados en el modelo de rata y ratón por IDPN, constatando la existencia de procesos moleculares compartidos en ambos. La disminución de inmunoreactividad correspondiente a *Spp1* y *FGF21* en epitelio y ganglio, respectivamente, corrobora que los cambios transcriptómicos observados tras el tratamiento con IDPN y estreptomina se reflejan en la expresión de la proteína correspondiente.

10. El tratamiento crónico por IDPN en rata y ratón causa una disminución en la expresión génica de *Spp1*, *Etv5*, *Camk1g*, *Slc17a6* y *Nptx2*. En ratones expuestos a IDPN crónico con un periodo de recuperación existe un restablecimiento completo o parcial de esta expresión. Además, todos estos genes muestran una menor expresión en ratones que han perdido en su totalidad las células ciliadas vestibulares a causa del tratamiento con alilnitrito. Los datos sugieren que el efecto del IDPN crónico sobre la expresión génica en el ganglio vestibular, es consecuencia, al menos parcialmente, de una menor actividad neuronal provocada por el desacople sináptico.

BIBLIOGRAFÍA

A

Agrawal, Y., Carey, J. P., Della Santina, C. C., Schubert, M. C., & Minor, L. B. (2009). Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2004. *Archives of internal medicine*, 169(10), 938–944. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.66>

Ahmed, A. E., & Farooqui, M. Y. (1982). Comparative toxicities of aliphatic nitriles. *Toxicology letters*, 12(2-3), 157–163. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(82\)90179-5](https://doi.org/10.1016/0378-4274(82)90179-5)

Alharazneh, A., Luk, L., Huth, M., Monfared, A., Steyger, P. S., Cheng, A. G., & Ricci, A. J. (2011). Functional hair cell mechanotransducer channels are required for aminoglycoside ototoxicity. *PLoS one*, 6(7), e22347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022347>

Ali, M. Z., & Goetz, M. B. (1997). A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of single daily dosing versus multiple daily dosing of aminoglycosides. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24(5), 796–809. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.5.796>

Amici, M., Eusebi, F., & Miledi, R. (2005). Effects of the antibiotic gentamicin on nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 49(5), 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.04.015>

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>

Aran, J. M., Erre, J. P., 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 oto-laryngologica. Supplementum*, 390, 1–30. <https://doi.org/10.3109/00016488209108895>

Arendt, K. L., Sarti, F., & Chen, L. (2013). Chronic inactivation of a neural circuit enhances LTP by inducing silent synapse formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(5), 2087–2096. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3880-12.2013>

Atkinson, P. J., Wise, A. K., Flynn, B. O., Nayagam, B. A., & Richardson, R. T. (2014). Hair cell regeneration after ATOH1 gene therapy in the cochlea of profoundly deaf adult guinea pigs. *PLoS one*, 9(7), e102077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102077>

Atkinson, P. J., Huarcaya Najarro, E., Sayyid, Z. N., & Cheng, A. G. (2015). Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development (Cambridge, England)*, 142(9), 1561–1571. <https://doi.org/10.1242/dev.114926>

B

Baird, R. A., Desmadryl, G., Fernández, C., & Goldberg, J. M. (1988). The vestibular nerve of the chinchilla. II. Relation between afferent response properties and peripheral innervation patterns in the semicircular canals. *Journal of neurophysiology*, 60(1), 182–203. <https://doi.org/10.1152/jn.1988.60.1.182>

Balak, K. J., Corwin, J. T., & Jones, J. E. (1990). Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(8), 2502–2512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-08-02502.1990>

Balbuena, E., & Llorens, J. (2001). Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain research*, 904(2), 298–306. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02476-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02476-3)

Balbuena, E., & Llorens, J. (2003). Comparison of cis- and trans-crotononitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicology and applied pharmacology*, 187(2), 89–100. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(02\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(02)00039-x)

Banea-Mayambu, J. P., Tylleskär, T., Gitebo, N., Matadi, N., Gebre-Medhin, M., & Rosling, H. (1997). Geographical and seasonal association between linamarin and cyanide exposure from cassava and the upper motor neurone disease konzo in former Zaire. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 2(12), 1143–1151. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1997.d01-215.x>

Bardien, S., Human, H., Harris, T., Hefke, G., Veikondis, R., Schaaf, H. S., van der Merwe, L., Greinwald, J. H., Fagan, J., & de Jong, G. (2009). A rapid method for detection of five known mutations associated with aminoglycoside-induced deafness. *BMC medical genetics*, 10, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-2>

Barone, S., Jr, Herr, D. W., & Crofton, K. M. (1995). Effects of 3,3'-iminodipropionitrile on the peripheral structures of the rat visual system. *Neurotoxicology*, 16(3), 451–467.

Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano S., & Brooks, H. L. (2012). Chapter 12. Reflex and Voluntary Control of Posture and Movement. In K. E. Barrett, S. M. Barman, S. Boitano, H. L. Brooks (Eds), *Ganong's Review of Medical Physiology*, 24e. Retrieved August 23, 2012 from <http://www.accessmedicine.com/libproxy2.umdj.edu/content.aspx?aID=562618044>

Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A., & Zoghbi, H. Y. (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5421), 1837–1841. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1837>

Besnard, S., Lopez, C., Brandt, T., Denise, P., & Smith, P. F. (2015). Editorial: The Vestibular System in Cognitive and Memory Processes in Mammals. *Frontiers in integrative neuroscience*, 9, 55. <https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00055>

Bhattacharyya, T. K., & Kumar, A. (2005). Vestibular cytotoxicity in gentamicin-treated frogs: a preliminary report. *American journal of otolaryngology*, 26(2), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2004.08.007>

Bird, J. E., Daudet, N., Warchol, M. E., & Gale, J. E. (2010). Supporting cells eliminate dying sensory hair cells to maintain epithelial integrity in the avian inner ear. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(37), 12545–12556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3042-10.2010>

- Black, F. O., Gianna-Poulin, C., & Pesznecker, S. C. (2001). Recovery from vestibular ototoxicity. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 22(5), 662–671. <https://doi.org/10.1097/00129492-200109000-00018>
- Black, F. O., Pesznecker, S., & Stallings, V. (2004). Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 25(4), 559–569. <https://doi.org/10.1097/00129492-200407000-00025>
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., & Llorens, J. (2005). Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 88(2), 456–466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi314>
- 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: an official journal of the Society of Toxicology*, 107(2), 461–472. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn233>
- Bohne, B. (1976) Mechanisms of noise damage in the inner ear. In D. Henderson, R.P. Hamernik, D.S. Dosanjh, and J.H. Mills (eds): *Effects of Noise on Hearing*. New York: Raven Press, pp. 41-68.
- Bonsacquet, J., Brugeaud, A., Compan, V., Desmadryl, G., & Chabbert, C. (2006). AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *The Journal of physiology*, 576(Pt 1), 63–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.116467>
- Boyle, R., Goldberg, J. M., & Highstein, S. M. (1992). Inputs from regularly and irregularly discharging vestibular nerve afferents to secondary neurons in squirrel monkey vestibular nuclei. III. Correlation with vestibulospinal and vestibuloocular output pathways. *Journal of neurophysiology*, 68(2), 471–484. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.2.471>
- Bright, J., & Khar, A. (1994). Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Bioscience reports*, 14(2), 67–81. <https://doi.org/10.1007/BF01210302>
- Brock, P. R., Knight, K. R., Freyer, D. R., Campbell, K. C., Steyger, P. S., Blakley, B. W., Rassekh, S. R., Chang, K. W., Fligor, B. J., Rajput, K., Sullivan, M., & Neuwelt, E. A. (2012). Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new International Society of Pediatric Oncology Boston ototoxicity scale. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(19), 2408–2417. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.1110>
- Bronstein, A. M., Golding, J. F., & Gresty, M. A. (2013). Vertigo and dizziness from environmental motion: visual vertigo, motion sickness, and drivers' disorientation. *Seminars in neurology*, 33(3), 219–230. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1354602>
- Burns, J. C., Cox, B. C., Thiede, B. R., Zuo, J., & Corwin, J. T. (2012). In vivo proliferative regeneration of balance hair cells in newborn mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(19), 6570–6577. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6274-11.2012>

Burns, J. C., Kelly, M. C., Hoa, M., Morell, R. J., & Kelley, M. W. (2015). Single-cell RNA-Seq resolves cellular complexity in sensory organs from the neonatal inner ear. *Nature communications*, 6, 8557. <https://doi.org/10.1038/ncomms9557>

C

Cai, T., Seymour, M. L., Zhang, H., Pereira, F. A., & Groves, A. K. (2013). Conditional deletion of *Atoh1* reveals distinct critical periods for survival and function of hair cells in the organ of Corti. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(24), 10110–10122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5606-12.2013>

Campbell, K. C., Meech, R. P., Klemens, J. J., Gerberi, M. T., Dyrstad, S. S., Larsen, D. L., Mitchell, D. L., El-Azizi, M., Verhulst, S. J., & Hughes, L. F. (2007). Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. *Hearing research*, 226(1-2), 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.11.012>

Campo, P., Morata, T. C., & Hong, O. (2013). Chemical exposure and hearing loss. *Disease-a-month: DM*, 59(4), 119–138. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.01.003>

Carpenter S. (1968). Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology*, 18(9), 841–851. <https://doi.org/10.1212/wnl.18.9.841>

Cassel, R., Bordiga, P., Carcaud, J., Simon, F., Beraneck, M., Le Gall, A., Benoit, A., Bouet, V., Philoxene, B., Besnard, S., Watabe, I., Pericat, D., Hautefort, C., Assie, A., Tonetto, A., Dyhrfeld-Johnsen, J., Llorens, J., Tighilet, B., & Chabbert, C. (2019). Morphological and functional correlates of vestibular synaptic deafferentation and repair in a mouse model of acute-onset vertigo. *Disease models & mechanisms*, 12(7), dmm039115. <https://doi.org/10.1242/dmm.039115>

Chakraborty, G., Jain, S., Behera, R., Ahmed, M., Sharma, P., Kumar, V., & Kundu, G. C. (2006). The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Current molecular medicine*, 6(8), 819–830. <https://doi.org/10.2174/156652406779010803>

Chen, D. H., Yu, J. W., & Jiang, B. J. (2015). Contactin 1: A potential therapeutic target and biomarker in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, 21(33), 9707–9716. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i33.9707>

Chen, Y., Huang, W. G., Zha, D. J., Qiu, J. H., Wang, J. L., Sha, S. H., & Schacht, J. (2007). Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: from the laboratory to the clinic. *Hearing research*, 226(1-2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.05.008>

Chiquet-Ehrismann R. (2004). Tenascins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(6), 986–990. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.002>

Cho, K. O., Hunt, C. A., & Kennedy, M. B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, 9(5), 929–942. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90245-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90245-9)

- Chonko, K. T., Jahan, I., Stone, J., Wright, M. C., Fujiyama, T., Hoshino, M., Fritsch, B., & Maricich, S. M. (2013). Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Developmental biology*, 381(2), 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.06.022>
- Chou, C. M., & Hartmann, H. A. (1964). Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. With a concept--"axostasis". *Acta neuropathologica*, 3, 428–450. <https://doi.org/10.1007/BF00688453>
- Chu, Y., & Corey, D. R. (2012). RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic acid therapeutics*, 22(4), 271–274. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0367>
- Cleeter, M. W., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *Journal of neurochemistry*, 58(2), 786–789. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09789.x>
- Climer, L. K., Cox, A. M., Reynolds, T. J., & Simmons, D. D. (2019). Oncomodulin: The Enigmatic Parvalbumin Protein. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 235. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00235>
- Colebatch, J. G., Rosengren, S. M., & Welgampola, M. S. (2016). Vestibular-evoked myogenic potentials. *Handbook of clinical neurology*, 137, 133–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63437-5.00010-8>
- Collado, M. S., Thiede, B. R., Baker, W., Askew, C., Igbani, L. M., & Corwin, J. T. (2011). The postnatal accumulation of junctional E-cadherin is inversely correlated with the capacity for supporting cells to convert directly into sensory hair cells in mammalian balance organs. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(33), 11855–11866. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2525-11.2011>
- Connors BW: Sensory transduction. In: *Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach*. 2nd ed., WF BORON, EL BOULPAEP (eds), Philadelphia, Saunders, 2012, pp 371-407.
- Corwin, J. T., & Cotanche, D. A. (1988). Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4860), 1772–1774. <https://doi.org/10.1126/science.3381100>
- Cotanche D. A. (1987). Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hearing research*, 30(2-3), 181–195. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(87\)90135-3](https://doi.org/10.1016/0378-5955(87)90135-3)
- Crofton, K. M., & Knight, T. (1991). Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat. *Neurotoxicology and teratology*, 13(6), 575–581. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(91\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0892-0362(91)90040-4)
- Crofton, K. M., Janssen, R., Prazma, J., Pulver, S., & Barone, S., Jr (1994). The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hearing research*, 80(2), 129–140. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90104-x](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90104-x)
- Cruz, R. M., Lambert, P. R., & Rubel, E. W. (1987). Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 113(10), 1058–1062. <https://doi.org/10.1001/archotol.1987.01860100036017>

Curthoys, I. S., Vulovic, V., & Manzari, L. (2012). Ocular vestibular-evoked myogenic potential (oVEMP) to test utricular function: neural and oculomotor evidence. *Acta otorhinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 32(1), 41–45.

Curthoys, I. S., & Manzari, L. (2013). Otolithic disease: clinical features and the role of vestibular evoked myogenic potentials. *Seminars in neurology*, 33(3), 231–237. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1354595>

Curthoys, I. S., Vulovic, V., Burgess, A. M., Manzari, L., Sokolic, L., Pogson, J., Robins, M., Mezey, L. E., Goonetilleke, S., Cornell, E. D., & MacDougall, H. G. (2014). Neural basis of new clinical vestibular tests: otolithic neural responses to sound and vibration. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 41(5), 371–380. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12222>

Curthoys, I. S., MacDougall, H. G., Vidal, P. P., & de Waele, C. (2017). Sustained and Transient Vestibular Systems: A Physiological Basis for Interpreting Vestibular Function. *Frontiers in neurology*, 8, 117. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00117>

D

Dalet, A., Bonsacquet, J., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chidavaenzi, R. L., Venteo, S., Desmadryl, G., Goldberg, J. M., Lysakowski, A., & Chabbert, C. (2012). Glutamate transporters EAAT4 and EAAT5 are expressed in vestibular hair cells and calyx endings. *PloS one*, 7(9), e46261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046261>

Deans M. R. (2013). A balance of form and function: planar polarity and development of the vestibular maculae. *Seminars in cell & developmental biology*, 24(5), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.03.001>

DeFelipe J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of chemical neuroanatomy*, 14(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(97\)10013-8](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(97)10013-8)

Delay, J., Bertagna, I., & Lauras, A. (1952). Surdit  hyst ro-organique ; action du choc amph taminique [Hystero-organic deafness; effect of amphetamine shock]. *Annales medico-psychologiques*, 110(2 2), 238–241.

Dem mes, D., & Sans, A. (1985). Pathological changes during the development of the vestibular sensory and ganglion cells of the Bronx waltzer mouse. *Scanning and transmission electron microscopy. Brain research*, 350(1-2), 285–295. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90272-x](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90272-x)

Desai, S. S., Zeh, C., & Lysakowski, A. (2005a). Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Saccular and utricular maculae. *Journal of neurophysiology*, 93(1), 251–266. <https://doi.org/10.1152/jn.00746.2003>

Desai, S. S., Ali, H., & Lysakowski, A. (2005b). Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares. *Journal of neurophysiology*, 93(1), 267–280. <https://doi.org/10.1152/jn.00747.2003>

Dilwali, S., Landegger, L. D., Soares, V. Y., Deschler, D. G., & Stankovic, K. M. (2015). Secreted Factors from Human Vestibular Schwannomas Can Cause Cochlear Damage. *Scientific reports*, 5, 18599. <https://doi.org/10.1038/srep18599>

Dowling, J. E. (1987). *The retina: an approachable part of the brain*. Harvard University Press.

Doyle, S., Pyndiah, S., De Gois, S., & Erickson, J. D. (2010). Excitation-transcription coupling via calcium/calmodulin-dependent protein kinase/ERK1/2 signaling mediates the coordinate induction of VGLUT2 and Narp triggered by a prolonged increase in glutamatergic synaptic activity. *The Journal of biological chemistry*, 285(19), 14366–14376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080069>

Duggal, P., & Sarkar, M. (2007). Audiologic monitoring of multi-drug resistant tuberculosis patients on aminoglycoside treatment with long term follow-up. *BMC ear, nose, and throat disorders*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1472-6815-7-5>

Dulon, D., Zajic, G., Aran, J. M., & Schacht, J. (1989). Aminoglycoside antibiotics impair calcium entry but not viability and motility in isolated cochlear outer hair cells. *Journal of neuroscience research*, 24(2), 338–346. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240226>

E

Eatock, R. A., Rüscher, A., Lysakowski, A., & Saeki, M. (1998). Hair cells in mammalian utricles. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 119(3), 172–181. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(98\)70052-X](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(98)70052-X)

Eatock, R. A., & Songer, J. E. (2011). Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annual review of neuroscience*, 34, 501–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113710>

Eatock R. A. (2018). Specializations for Fast Signaling in the Amniote Vestibular Inner Ear. *Integrative and comparative biology*, 58(2), 341–350. <https://doi.org/10.1093/icb/icy069>

Ebeid, M., & Huh, S. H. (2020). Mesenchymal ETV transcription factors regulate cochlear length. *Hearing research*, 396, 108039. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.108039>

Einheber, S., Zanazzi, G., Ching, W., Scherer, S., Milner, T. A., Peles, E., & Salzer, J. L. (1997). The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neuexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *The Journal of cell biology*, 139(6), 1495–1506. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.6.1495>

Ekdale E. G. (2016). Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of anatomy*, 228(2), 324–337. <https://doi.org/10.1111/joa.12308>

El-Tanani, M. K., Campbell, F. C., Kurisetty, V., Jin, D., McCann, M., & Rudland, P. S. (2006). The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(6), 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.09.010>

Esterberg, R., Linbo, T., Pickett, S. B., Wu, P., Ou, H. C., Rubel, E. W., & Raible, D. W. (2016). Mitochondrial calcium uptake underlies ROS generation during aminoglycoside-induced hair cell death. *The Journal of clinical investigation*, 126(9), 3556–3566. <https://doi.org/10.1172/JCI84939>

F

Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M., & Bhat, M. A. (2004). Drosophila contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development (Cambridge, England)*, 131(20), 4931–4942. <https://doi.org/10.1242/dev.01372>

Falk, J., Bonnon, C., Girault, J. A., & Faivre-Sarrailh, C. (2002). F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biology of the cell*, 94(6), 327–334. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(02\)00006-0](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(02)00006-0)

Fechter, L. D., Liu, Y., Herr, D. W., & Crofton, K. M. (1998). Trichloroethylene ototoxicity: evidence for a cochlear origin. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 42(1), 28–35. <https://doi.org/10.1006/toxs.1997.2413>

Fee W. E., Jr (1980). Aminoglycoside ototoxicity in the human. *The Laryngoscope*, 90(10 Pt 2 Suppl 24), 1–19. <https://doi.org/10.1288/00005537-198010001-00001>

Fermin, C. D., Lychakov, D., Campos, A., Hara, H., Sondag, E., Jones, T., Jones, S., Taylor, M., Meza-Ruiz, G., & Martin, D. S. (1998). Otoconia biogenesis, phylogeny, composition and functional attributes. *Histology and histopathology*, 13(4), 1103–1154. <https://doi.org/10.14670/HH-13.1103>

Fettiplace, R., & Hackney, C. M. (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), 19–29. <https://doi.org/10.1038/nrn1828>

Fettiplace, R., & Nam, J. H. (2019). Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells. *Hearing research*, 376, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.002>

Fischel-Ghodsian, N., Kopke, R. D., & Ge, X. (2004). Mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Mitochondrion*, 4(5-6), 675–694. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.040>

Fischel-Ghodsian N. (2005). Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics*, 6(1), 27–36. <https://doi.org/10.1517/14622416.6.1.27>

Fleming, F. F., Yao, L., Ravikumar, P. C., Funk, L., & Shook, B. C. (2010). Nitrile-containing pharmaceuticals: efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *Journal of medicinal chemistry*, 53(22), 7902–7917. <https://doi.org/10.1021/jm100762r>

Foley P. (2012). The ability to stand is not diagnostic in vertigo. *BMJ (Clinical research ed.)*, 345, e6542–e6544. <https://doi.org/10.1136/bmj.e6542>

Forgacs J. (1960). *Archives d'ophtalmologie et revue generale d'ophtalmologie*, 20, 275–284.

Forge, A., Li, L., Corwin, J. T., & Nevill, G. (1993). Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5101), 1616–1619. <https://doi.org/10.1126/science.8456284>

Forge, A., & Li, L. (2000). Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hearing research*, 139(1-2), 97–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00177-X)

Forge, A., & Schacht, J. (2000). Aminoglycoside antibiotics. *Audiology & neuro-otology*, 5(1), 3–22. <https://doi.org/10.1159/000013861>

G

Gale, J. E., Marcotti, W., Kennedy, H. J., Kros, C. J., & Richardson, G. P. (2001). FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7013–7025. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07013.2001>

Genter, M. B., Llorens, J., O'Callaghan, J. P., Peele, D. B., Morgan, K. T., & Crofton, K. M. (1992). Olfactory toxicity of beta, beta'-iminodipropionitrile in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 263(3), 1432–1439.

Getahun, H., Lambein, F., Vanhoorne, M., & Van der Stuyft, P. (2002). Pattern and associated factors of the neurolathyrism epidemic in Ethiopia. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 7(2), 118–124. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00836.x>

Getahun, H., Lambein, F., Vanhoorne, M., & Van der Stuyft, P. (2005). Neurolathyrism risk depends on type of grass pea preparation and on mixing with cereals and antioxidants. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 10(2), 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01370.x>

Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., ... Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(6982), 493–521. <https://doi.org/10.1038/nature02426>

Gilbert DN. Aminoglycosides. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; p. 307-36.

Goldberg, J. M., Smith, C. E., & Fernández, C. (1984). Relation between discharge regularity and responses to externally applied galvanic currents in vestibular nerve afferents of the squirrel monkey. *Journal of neurophysiology*, 51(6), 1236–1256. <https://doi.org/10.1152/jn.1984.51.6.1236>

Goldberg J. M. (2000). Afferent diversity and the organization of central vestibular pathways. *Experimental brain research*, 130(3), 277–297. <https://doi.org/10.1007/s002210050033>

Goldin, A., & Noe, H. A. (1948). A neurological syndrome induced by administration of some chlorinated tertiary amines. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 94(3), 249–261.

Golub, J. S., Tong, L., Ngyuen, T. B., Hume, C. R., Palmiter, R. D., Rubel, E. W., & Stone, J. S. (2012). Hair cell replacement in adult mouse utricles after targeted ablation of hair cells with diphtheria toxin. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(43), 15093–15105. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1709-12.2012>

Granados, O., & Meza, G. (2005). Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin in vivo, is vestibulotoxic in rats. *Histology and histopathology*, 20(2), 357–364. <https://doi.org/10.14670/HH-20.357>

Gray, L. (2020). Chapter 10. Vestibular System: Structure and Function. James Madison University. <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s2/chapter10.html>

Greguske, E. (2019). Vestibular Damage and Repair in Chronic Ototoxicity: Cellular Stages, Physiological Deficits and Molecular Mechanisms (Tesis doctoral, Universitat de Barcelona).

Greguske, E. A., Carreres-Pons, M., Cutillas, B., Boadas-Vaello, P., & Llorens, J. (2019). Calyx junction dismantlement and synaptic uncoupling precede hair cell extrusion in the vestibular sensory epithelium during sub-chronic 3,3'-iminodipropionitrile ototoxicity in the mouse. *Archives of toxicology*, 93(2), 417–434. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2339-0>

Greguske, E. A., Llorens, J., & Pyott, S. J. (2021). Assessment of cochlear toxicity in response to chronic 3,3'-iminodipropionitrile in mice reveals early and reversible functional loss that precedes overt histopathology. *Archives of toxicology*, 95(3), 1003–1021. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02962-5>

Griffin, J. W., Hoffman, P. N., Clark, A. W., Carroll, P. T., & Price, D. L. (1978). Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment of beta, beta'-iminodipropionitrile administration. *Science (New York, N.Y.)*, 202(4368), 633–635. <https://doi.org/10.1126/science.81524>

Groves A. K. (2010). The challenge of hair cell regeneration. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 235(4), 434–446. <https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009281>

Guan M. X. (2004). Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011, 259–271. https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2_25

Guan M. X. (2011). Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*, 11(2), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.10.006>

H

Hain, T. C., & Helminski, J. O. (2007). Anatomy and Physiology of the Normal Vestibular System. In S.J. Herdman (Ed). *Vestibular Rehabilitation*. Philadelphia, PA: F.A. Davis Company.

Halmagyi, G. M., & Curthoys, I. S. (1988). A clinical sign of canal paresis. *Archives of neurology*, 45(7), 737–739. <https://doi.org/10.1001/archneur.1988.00520310043015>

Halmagyi, G. M., Chen, L., MacDougall, H. G., Weber, K. P., McGarvie, L. A., & Curthoys, I. S. (2017). The Video Head Impulse Test. *Frontiers in neurology*, 8, 258. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00258>

Hanada, Y., Nakamura, Y., Ozono, Y., Ishida, Y., Takimoto, Y., Taniguchi, M., Ohata, K., Koyama, Y., Imai, T., Morihana, T., Kondo, M., Sato, T., Inohara, H., & Shimada, S. (2018). Fibroblast growth factor 12 is expressed in spiral and vestibular ganglia and necessary for auditory and equilibrium function. *Scientific reports*, 8(1), 11491. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28618-0>

Harrill, J. A., Knapp, G. W., & Crofton, K. M. (2010). Splice variant specific increase in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase 1-gamma mRNA expression in response to acute pyrethroid exposure. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 24(3), 174–186. <https://doi.org/10.1002/jbt.20324>

Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y., & Minakami, S. (1990). 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochemical and biophysical research communications*, 170(3), 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)90498-c](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)90498-c)

Hawkins, J.E., and L-G. Johnsson (1981) Histopathology of cochlear and vestibular ototoxicity in laboratory animals. In S.A. Lerner, G.J. Matz, and J.E. Hawkins (eds): *Aminoglycoside Ototoxicity*. Boston: Little Brown and Co., pp. 175-195.

Head, J. R., Gacioch, L., Pennisi, M., & Meyers, J. R. (2013). Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 242(7), 832–846. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23973>

Heath, H., & Rutter, A. C. (1966). Retinal angiopathy in the imino-dipropionitrile-treated alloxan-diabetic rat. *British journal of experimental pathology*, 47(2), 116–120.

Hirvonen, T. P., Minor, L. B., Hullar, T. E., & Carey, J. P. (2005). Effects of intratympanic gentamicin on vestibular afferents and hair cells in the chinchilla. *Journal of neurophysiology*, 93(2), 643–655. <https://doi.org/10.1152/jn.00160.2004>

Hoet, P., & Lison, D. (2008). Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Critical reviews in toxicology*, 38(2), 127–170. <https://doi.org/10.1080/10408440701845443>

Hoffman, L. F., Choy, K. R., Sultemeier, D. R., & Simmons, D. D. (2018). Oncomodulin Expression Reveals New Insights into the Cellular Organization of the Murine Utricle Striola. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 19(1), 33–51. <https://doi.org/10.1007/s10162-017-0652-6>

Howarth, C., Gleason, P., & Attwell, D. (2012). Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), 1222–1232. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.35>

Huh, S. H., Warchol, M. E., & Ornitz, D. M. (2015). Cochlear progenitor number is controlled through mesenchymal FGF receptor signaling. *eLife*, 4, e05921. <https://doi.org/10.7554/eLife.05921>

Hullar, T. E., Della Santina, C. C., Hirvonen, T., Lasker, D. M., Carey, J. P., & Minor, L. B. (2005). Responses of irregularly discharging chinchilla semicircular canal vestibular-nerve afferents during high-frequency head rotations. *Journal of neurophysiology*, 93(5), 2777–2786. <https://doi.org/10.1152/jn.01002.2004>

Hunt, M. A., Miller, S. W., Nielson, H. C., & Horn, K. M. (1987). Intratympanic injection of sodium arsenilate (atoxyl) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behavioral neuroscience*, 101(3), 427–428. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.101.3.427>

Hunt, C. A., Schenker, L. J., & Kennedy, M. B. (1996). PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(4), 1380–1388. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-04-01380.1996>

Hurley, K. M., Gaboyard, S., Zhong, M., Price, S. D., Woollorton, J. R., Lysakowski, A., & Eatock, R. A. (2006). M-like K⁺ currents in type I hair cells and calyx afferent endings of the developing rat utricle. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), 10253–10269. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2596-06.2006>

Hutchin, T., & Cortopassi, G. (1994). Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(11), 2517–2520. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.11.2517>

Huth, M. E., Ricci, A. J., & Cheng, A. G. (2011). Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *International journal of otolaryngology*, 2011, 937861. <https://doi.org/10.1155/2011/937861>

Huth, M. E., Han, K. H., Sotoudeh, K., Hsieh, Y. J., Effertz, T., Vu, A. A., Verhoeven, S., Hsieh, M. H., Greenhouse, R., Cheng, A. G., & Ricci, A. J. (2015). Designer aminoglycosides prevent cochlear hair cell loss and hearing loss. *The Journal of clinical investigation*, 125(2), 583–592. <https://doi.org/10.1172/JCI77424>

I

Ishiyama, G., López, I. A., & Ishiyama, A. (2006). Aquaporins and Meniere's disease. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 14(5), 332–336. <https://doi.org/10.1097/01.moo.0000244191.51560.22>

Ishiyama G. (2009). Imbalance and vertigo: the aging human vestibular periphery. *Seminars in neurology*, 29(5), 491–499. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241039>

Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K. A., Swiderski, D. L., Dolan, D. F., Brough, D. E., & Raphael, Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature medicine*, 11(3), 271–276. <https://doi.org/10.1038/nm1193>

Izumikawa, M., Batts, S. A., Miyazawa, T., Swiderski, D. L., & Raphael, Y. (2008). Response of the flat cochlear epithelium to forced expression of Atoh1. *Hearing research*, 240(1-2), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.02.007>

J

Jacques, B. E., Montgomery, W. H., 4th, Uribe, P. M., Yatteau, A., Asuncion, J. D., Resendiz, G., Matsui, J. I., & Dabdoub, A. (2014). The role of Wnt/ β -catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line. *Developmental neurobiology*, 74(4), 438–456. <https://doi.org/10.1002/dneu.22134>

Jagger, D. J., & Forge, A. (2006). Compartmentalized and signal-selective gap junctional coupling in the hearing cochlea. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(4), 1260–1268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4278-05.2006>

Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell*, 73(7), 1307–1321. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90358-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90358-w)

Jarman, A. P., Grell, E. H., Ackerman, L., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1994). Atonal is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature*, 369(6479), 398–400. <https://doi.org/10.1038/369398a0>

Jiang, M., Karasawa, T., & Steyger, P. S. (2017). Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 308. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00308>

Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E., & Adamopoulos, I. E. (2016). The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity reviews*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.009>

Jiménez-Díaz, C., Ortiz de Landázuri, E., Roda, E. (1943). Estudios sobre el latirismo VI. Síntesis de datos clínicos y experimentales para el conocimiento de la patogenia del latirismo. *Rev. Clin. Esp.* 8, 154–167

Jones, P. L., & Jones, F. S. (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 19(7), 581–596. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(00\)00106-2](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(00)00106-2)

Jones-López, E. C., Ayakaka, I., Levin, J., Reilly, N., Mumbowa, F., Dryden-Peterson, S., Nyakoojo, G., Fennelly, K., Temple, B., Nakubulwa, S., Joloba, M. L., Okwera, A., Eisenach, K. D., McNerney, R., Elliott, A. M., Ellner, J. J., Smith, P. G., & Mugerwa, R. D. (2011). Effectiveness of the standard WHO recommended retreatment regimen (category II) for tuberculosis in Kampala, Uganda: a prospective cohort study. *PLoS medicine*, 8(3), e1000427. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000427>

Jung, J. Y., Avenarius, M. R., Adamsky, S., Alpert, E., Feinstein, E., & Raphael, Y. (2013). siRNA targeting Hes5 augments hair cell regeneration in aminoglycoside-damaged mouse utricle. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(4), 834–841. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.18>

K

Kaiser, A., Fedrowitz, M., Ebert, U., Zimmermann, E., Hedrich, H. J., Wedekind, D., & Löscher, W. (2001). Auditory and vestibular defects in the circling (ci2) rat mutant. *The European journal of neuroscience*, 14(7), 1129–1142. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01726.x>

Kalinec, G. M., Webster, P., Lim, D. J., & Kalinec, F. (2003). A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiology & neuro-otology*, 8(4), 177–189. <https://doi.org/10.1159/000071059>

Kalinec F. (2005). High-throughput screening of ototoxic and otoprotective pharmacological drugs. *The Volta Review* 105: 385–408.

Karasawa, T., & Steyger, P. S. (2011). Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*, 3(9), 879–886. <https://doi.org/10.1039/c1ib00034a>

Kaski, D., & Bronstein, A. M. (2012). Making a diagnosis in patients who present with vertigo. *BMJ (Clinical research ed.)*, 345, e5809. <https://doi.org/10.1136/bmj.e5809>

Kelley M. W. (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(11), 837–849. <https://doi.org/10.1038/nrn1987>

Kenyon, E. J., Kirkwood, N. K., Kitcher, S. R., Goodyear, R. J., Derudas, M., Cantillon, D. M., Baxendale, S., de la Vega de León, A., Mahieu, V. N., Osgood, R. T., Wilson, C. D., Bull, J. C., Waddell, S. J., Whitfield, T. T., Ward, S. E., Kros, C. J., & Richardson, G. P. (2021). Identification of a series of hair-cell MET channel blockers that protect against aminoglycoside-induced ototoxicity. *JCI insight*, 6(7), e145704. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145704>

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Kevetter, G. A., & Leonard, R. B. (2002). Molecular probes of the vestibular nerve. II. Characterization of neurons in Scarpa's ganglion to determine separate populations within the nerve. *Brain research*, 928(1-2), 18–29. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03264-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03264-4)

Khan, S., & Chang, R. (2013). Anatomy of the vestibular system: a review. *NeuroRehabilitation*, 32(3), 437–443. <https://doi.org/10.3233/NRE-130866>

Kheradmand, A., Bronstein, A., Zee, D.S., 2013. Clinical bedside examination. In: Bronstein, A.M. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 123–136.

Kim, Y. J., Tian, C., Kim, J., Shin, B., Choo, O. S., Kim, Y. S., & Choung, Y. H. (2017). Autophagic flux, a possible mechanism for delayed gentamicin-induced ototoxicity. *Scientific reports*, 7, 41356. <https://doi.org/10.1038/srep41356>

Kimoto, S., Zaki, M. M., Bazmi, H. H., & Lewis, D. A. (2015). Altered Markers of Cortical γ -Aminobutyric Acid Neuronal Activity in Schizophrenia: Role of the NARP Gene. *JAMA psychiatry*, 72(8), 747–756. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0533>

Kusaba, T., Lalli, M., Kramann, R., Kobayashi, A., & Humphreys, B. D. (2014). Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1527–1532. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310653110>

L

Lahne, M., & Gale, J. E. (2008). Damage-induced activation of ERK1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(19), 4918–4928. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4914-07.2008>

Lee, J. H., Park, C., Kim, S. J., Kim, H. J., Oh, G. S., Shen, A., So, H. S., & Park, R. (2013). Different uptake of gentamicin through TRPV1 and TRPV4 channels determines cochlear hair cell vulnerability. *Experimental & molecular medicine*, 45(3), e12. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.25>

Lee, S. J., Wei, M., Zhang, C., Maxeiner, S., Pak, C., Calado Botelho, S., Trotter, J., Sterky, F. H., & Südhof, T. C. (2017). Presynaptic Neuronal Pentraxin Receptor Organizes Excitatory and Inhibitory Synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(5), 1062–1080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-16.2016>

Leonard, R. B., & Kevetter, G. A. (2002). Molecular probes of the vestibular nerve. I. Peripheral termination patterns of calretinin, calbindin and peripherin containing fibers. *Brain research*, 928(1-2), 8–17. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03268-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03268-1)

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*, 355(3), 405–417. <https://doi.org/10.1002/cne.903550307>

Lieberman, M. C., Dodds, L. W., & Pierce, S. (1990). Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *The Journal of comparative neurology*, 301(3), 443–460. <https://doi.org/10.1002/cne.903010309>

Lieberman, L. D., Wang, H., & Liberman, M. C. (2011). Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(3), 801–808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-10.2011>

Lienhardt, C., Glaziou, P., Uplekar, M., Lönnroth, K., Getahun, H., & Raviglione, M. (2012). Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nature reviews. Microbiology*, 10(6), 407–416. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2797>

Lin, V., Golub, J. S., Nguyen, T. B., Hume, C. R., Oesterle, E. C., & Stone, J. S. (2011). Inhibition of Notch activity promotes nonmitotic regeneration of hair cells in the adult mouse utricles. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(43), 15329–15339. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2057-11.2011>

Lindeman H. H. (1969). Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta oto-laryngologica*, 67(2), 177–189. <https://doi.org/10.3109/00016486909125441>

Liu, K., Jiang, X., Shi, C., Shi, L., Yang, B., Shi, L., Xu, Y., Yang, W., & Yang, S. (2013). Cochlear inner hair cell ribbon synapse is the primary target of ototoxic aminoglycoside stimuli. *Molecular neurobiology*, 48(3), 647–654. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8454-2>

Liu, W., & Davis, R. L. (2014). Calretinin and calbindin distribution patterns specify subpopulations of type I and type II spiral ganglion neurons in postnatal murine cochlea. *The Journal of comparative neurology*, 522(10), 2299–2318. <https://doi.org/10.1002/cne.23535>

Lombarte, A., Yan, H. Y., Popper, A. N., Chang, J. S., & Platt, C. (1993). Damage and regeneration of hair cell ciliary bundles in a fish ear following treatment with gentamicin. *Hearing research*, 64(2), 166–174. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90002-i](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90002-i)

Lopez, I., Honrubia, V., Lee, S. C., Schoeman, G., & Beykirch, K. (1997). Quantification of the process of hair cell loss and recovery in the chinchilla crista ampullaris after gentamicin treatment. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 15(4-5), 447–461. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(96\)00103-7](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(96)00103-7)

Llorens, J., Crofton, K. M., & O'Callaghan, J. P. (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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 265(3), 1492–1498.

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(2), 199–210. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1238>

Llorens, J., & Demêmes, D. (1994). Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia. *Hearing research*, 76(1-2), 78–86. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90090-6)

Llorens, J., & Rodríguez-Farré, E. (1997). Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicology and teratology*, 19(2), 117–127. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(96\)00216-4](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(96)00216-4)

Llorens, J., Aguilló, A., & Rodríguez-Farré, E. (1998). Behavioral disturbances and vestibular pathology following crotonitrile exposure in rats. *Journal of the peripheral nervous system: JPNS*, 3(3), 189–196.

Lombardi, D., Becherucci, F., & Romagnani, P. (2016). How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 31(8), 1243–1250. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv262>

Loo, Y. M., & Gale, M., Jr (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>

Lysakowski, A., & Goldberg, J. M. (1997). A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *The Journal of comparative neurology*, 389(3), 419–443. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19971222\)389:3<419::aid-cne5>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971222)389:3<419::aid-cne5>3.0.co;2-3)

Lysakowski, A., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chatlani, S., Price, S. D., & Eatock, R. A. (2011). Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(27), 10101–10114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0521-11.2011>

M

Ma, E. Y., Rubel, E. W., & Raible, D. W. (2008). Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(9), 2261–2273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4372-07.2008>

Maetzler, W., Berg, D., Schalamberidze, N., Melms, A., Schott, K., Mueller, J. C., Liaw, L., Gasser, T., & Nitsch, C. (2007). Osteopontin is elevated in Parkinson's disease and its absence leads to reduced neurodegeneration in the MPTP model. *Neurobiology of disease*, 25(3), 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.10.020>

Marcotti, W., van Netten, S. M., & Kros, C. J. (2005). The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *The Journal of physiology*, 567(Pt 2), 505–521. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.085951>

Maroto, A. F., Barrallo-Gimeno, A., & Llorens, J. (2021). Relationship between vestibular hair cell loss and deficits in two anti-gravity reflexes in the rat. *Hearing research*, 410, 108336. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2021.108336>

Martin, T., Moussay, S., Bulla, I., Bulla, J., Toupet, M., Etard, O., Denise, P., Davenne, D., Coquerel, A., & Quarck, G. (2016). Exploration of Circadian Rhythms in Patients with Bilateral Vestibular Loss. *PloS one*, 11(6), e0155067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155067>

Martins-Lopes, V. (2017). Objective and Quantitative Assessment of Tail-lift Reflex in the Rat Model (Trabajo final de máster, Universitat de Barcelona).

Martins-Lopes, V., Bellmunt, A., Greguske, E. A., Maroto, A. F., Boadas-Vaello, P., & Llorens, J. (2019). Quantitative Assessment of Anti-Gravity Reflexes to Evaluate Vestibular Dysfunction in Rats. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 20(6), 553–563. <https://doi.org/10.1007/s10162-019-00730-6>

Matsui, J. I., Ogilvie, J. M., & Warchol, M. E. (2002). Inhibition of caspases prevents ototoxic and ongoing hair cell death. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(4), 1218–1227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-04-01218.2002>

Matt, T., Ng, C. L., Lang, K., Sha, S. H., Akbergenov, R., Shcherbakov, D., Meyer, M., Duscha, S., Xie, J., Dubbaka, S. R., Perez-Fernandez, D., Vasella, A., Ramakrishnan, V., Schacht, J., & Böttger, E. C. (2012). Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptomycin apramycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(27), 10984–10989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204073109>

McCall, A. A., & Yates, B. J. (2011). Compensation following bilateral vestibular damage. *Frontiers in neurology*, 2, 88. <https://doi.org/10.3389/fneur.2011.00088>

McFadden, S. L., Ding, D., Jiang, H., Woo, J. M., & Salvi, R. J. (2002). Chinchilla models of selective cochlear hair cell loss. *Hearing research*, 174(1-2), 230–238. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00697-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00697-4)

McInturff, S., Burns, J. C., & Kelley, M. W. (2018). Characterization of spatial and temporal development of Type I and Type II hair cells in the mouse utricle using new cell-type-specific markers. *Biology open*, 7(11), bio038083. <https://doi.org/10.1242/bio.038083>

Merchant, S. N., Rauch, S. D., & Nadol, J. B., Jr (1995). Ménière's disease. *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 252(2), 63–75. <https://doi.org/10.1007/BF00168023>

Mescher, A. L. (2010). Chapter 23. The Eye and Ear: Special Sense Organs. In A.L. Mescher (Ed), *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*, 12e. Retrieved August 23, 2012 from <http://www.accessmedicine.com.libproxy2.umdj.edu/content.aspx?aID=61832633>

Meza, G., López, I., Paredes, M. A., Peñalosa, Y., & Poblano, A. (1989). Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta oto-laryngologica*, 107(5-6), 406–411. <https://doi.org/10.3109/00016488909127530>

Meza, G., Daunton, N., Fox, R., López-Griego, L., Pratt, H., & Zepeda, H. (1994). Vestibulotoxicity of streptomycin in the pigmented rat. *Collegium Otorhinolaryngol. Abstr*, 57, 45-46.

Meza, G., Bohne, B., Daunton, N., Fox, R., & Knox, J. (1996). Damage and recovery of otolithic function following streptomycin treatment in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 781, 666–669. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb15754.x>

Meza, G., & Aguilar-Maldonado, B. (2007). Streptomycin action to the mammalian inner ear vestibular organs: comparison between pigmented guinea pigs and rats. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 146(1-2), 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.006>

Moczydlowski eg: Electrical excitability and action potentials. In: *Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach*. 2nd ed., WF BORON, EL BOULPAEP (eds), Philadelphia, Saunders, 2012a, pp 192-194.

Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *The Veterinary record*, 116(16), 431–436. <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>

Murillo-Cuesta, S., García-Alcántara, F., Vacas, E., Sistiaga, J. A., Camarero, G., Varela-Nieto, I., & Rivera, T. (2009). Direct drug application to the round window: a comparative study of ototoxicity in rats. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 141(5), 584–590. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2009.07.014>

Murillo-Cuesta, S., Contreras, J., Cediél, R., & Varela-Nieto, I. (2010). Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Laboratory animals*, 44(2), 124–131. <https://doi.org/10.1258/la.2009.009046>

N

Nakagawa, T., Yamane, H., Shibata, S., & Nakai, Y. (1997). Gentamicin ototoxicity induced apoptosis of the vestibular hair cells of guinea pigs. *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 254(1), 9–14. <https://doi.org/10.1007/BF02630749>

Nakayama, M., Riggs, L. C., & Matz, G. J. (1996). Quantitative study of vestibulotoxicity induced by gentamicin or cisplatin in the guinea pig. *The Laryngoscope*, 106(2 Pt 1), 162–167. <https://doi.org/10.1097/00005537-199602000-00011>

Naughton C. A. (2008). Drug-induced nephrotoxicity. *American family physician*, 78(6), 743–750.

O

Oesterle, E. C., Campbell, S., Taylor, R. R., Forge, A., & Hume, C. R. (2008). Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 9(1), 65–89. <https://doi.org/10.1007/s10162-007-0106-7>

Oishi, N., Duscha, S., Boukari, H., Meyer, M., Xie, J., Wei, G., Schrepfer, T., Roschitzki, B., Boettger, E. C., & Schacht, J. (2015). XBP1 mitigates aminoglycoside-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell death. *Cell death & disease*, 6(5), e1763. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.108>

Ono, K., Keller, J., López Ramírez, O., González Garrido, A., Zobeiri, O. A., Chang, H., Vijayakumar, S., Ayiotis, A., Duester, G., Della Santina, C. C., Jones, S. M., Cullen, K. E., Eatock, R. A., & Wu, D. K. (2020). Retinoic acid degradation shapes zonal development of vestibular organs and sensitivity to transient linear accelerations. *Nature communications*, 11(1), 63. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13710-4>

Ossenkopp, K. P., Prkacin, A., & Hargreaves, E. L. (1990). Sodium arsenite-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 36(4), 875–881. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90093-w](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90093-w)

P

Pagano, P. J., & Haurani, M. J. (2006). Vascular cell locomotion: osteopontin, NADPH oxidase, and matrix metalloproteinase-9. *Circulation research*, 98(12), 1453–1455. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000231258.23378.a6>

Pan, N., Jahan, I., Kersigo, J., Kopecky, B., Santi, P., Johnson, S., Schmitz, H., & Fritsch, B. (2011). Conditional deletion of Atoh1 using Pax2-Cre results in viable mice without differentiated cochlear hair cells that have lost most of the organ of Corti. *Hearing research*, 275(1-2), 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.12.002>

Pancoast S. J. (1988). Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *The Medical clinics of North America*, 72(3), 581–612. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30760-x](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30760-x)

Pellis, S. M., Pellis, V. C., Morrissey, T. K., & Teitelbaum, P. (1989). Visual modulation of vestibularly-triggered air-righting in the rat. *Behavioural brain research*, 35(1), 23–26. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(89\)80004-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(89)80004-x)

Pellis, S. M., Pellis, V. C., & Teitelbaum, P. (1991). Labyrinthine and other supraspinal inhibitory controls over head-and-body ventroflexion. *Behavioural brain research*, 46(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80101-9](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80101-9)

Peloquin, C. A., Berning, S. E., Nitta, A. T., Simone, P. M., Goble, M., Huitt, G. A., Iseman, M. D., Cook, J. L., & Curran-Everett, D. (2004). Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(11), 1538–1544. <https://doi.org/10.1086/420742>

Pouyatos, B., Campo, P., & Lataye, R. (2002). Use of DPOAEs for assessing hearing loss caused by styrene in the rat. *Hearing research*, 165(1-2), 156–164. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00298-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00298-8)

Pujol, R., Pickett, S. B., Nguyen, T. B., & Stone, J. S. (2014). Large basolateral processes on type II hair cells are novel processing units in mammalian vestibular organs. *The Journal of comparative neurology*, 522(14), 3141–3159. <https://doi.org/10.1002/cne.23625>

Q

Quinn, K. J., Rude, S. A., Brettler, S. C., & Baker, J. F. (1998). Chronic recording of the vestibulo-ocular reflex in the restrained rat using a permanently implanted scleral search coil. *Journal of neuroscience methods*, 80(2), 201–208. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(98\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(98)00005-3)

R

Raphael Y. (1993). Reorganization of the chick basilar papilla after acoustic trauma. *The Journal of comparative neurology*, 330(4), 521–532. <https://doi.org/10.1002/cne.903300408>

Ricci, A. J., Cochran, S. L., Rennie, K. J., & Correia, M. J. (1997). Vestibular type I and type II hair cells. 2: Morphometric comparisons of dissociated pigeon hair cells. *Journal of vestibular research: equilibrium & orientation*, 7(5), 407–420.

Ropper, A. H., & Samuels, M. A. (2009). Chapter 15. Deafness, Dizziness, and Disorders of Equilibrium. In A.H. Ropper, M.A. Samuels (Eds), *Adams and Victor's Principles of Neurology*, 9e. Retrieved August 17, 2012 from <http://www.accessmedicine.com.libproxy2.umdnj.edu/content.aspx?aID=3632043>

Rotstein C, Mandell L (2004) Clinical aminoglycoside ototoxicity. In: Roland P, Rutka J (eds) *Ototoxicity*. BC Decker, Hamilton, Ontario, pp 82–92

Rúa, F., Buffard, M., Sedó-Cabezón, L., Hernández-Mir, G., de la Torre, A., Saldaña-Ruiz, S., Chabbert, C., Bayona, J. M., Messeguer, A., & Llorens, J. (2013). Vestibulotoxic properties of potential metabolites of allylnitrile. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 135(1), 182–192. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft127>

Rubel, E. W., Watt, F. M., Potten, C. S., Farbman, A. I., Lewis, J., Calof, A. L., ... & Ryals, B. M. (1991). Regeneration of Vertebrate Sensory Receptor-Cells-Final General Discussion. In *Ciba Foundation Symposia* (Vol. 160, pp. 314-329).

Rubel, E. W., Furrer, S. A., & Stone, J. S. (2013). A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hearing research*, 297, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.12.014>

Russell, N. A., Horii, A., Smith, P. F., Darlington, C. L., & Bilkey, D. K. (2003). Long-term effects of permanent vestibular lesions on hippocampal spatial firing. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(16), 6490–6498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-16-06490.2003>

Ryals, B. M., & Rubel, E. W. (1988). Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* (New York, N.Y.), 240(4860), 1774–1776. <https://doi.org/10.1126/science.3381101>

S

Sadeghi, S. G., Minor, L. B., & Cullen, K. E. (2007). Response of vestibular-nerve afferents to active and passive rotations under normal conditions and after unilateral labyrinthectomy. *Journal of neurophysiology*, 97(2), 1503–1514. <https://doi.org/10.1152/jn.00829.2006>

Sakagami M. (2000). Role of osteopontin in the rodent inner ear as revealed by in situ hybridization. *Medical electron microscopy: official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*, 33(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s007950000001>

Saldaña-Ruiz, S., Hernández-Mir, G., Sedó-Cabezón, L., Cutillas, B., & Llorens, J. (2012). Vestibular toxicity of cis-2-pentenenitrile in the rat. *Toxicology letters*, 211(3), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.04.010>

Saldaña-Ruiz, 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. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 14(5), 661–671. <https://doi.org/10.1007/s10162-013-0399-7>

Saunders, J. C., Dear, S. P., & Schneider, M. E. (1985). The anatomical consequences of acoustic injury: A review and tutorial. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 78(3), 833–860. <https://doi.org/10.1121/1.392915>

Schacht J. (1986). Molecular mechanisms of drug-induced hearing loss. *Hearing research*, 22, 297–304. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(86\)90105-x](https://doi.org/10.1016/0378-5955(86)90105-x)

Schacht, J., Talaska, A. E., & Rybak, L. P. (2012). Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anatomical record* (Hoboken, N.J.: 2007), 295(11), 1837–1850. <https://doi.org/10.1002/ar.22578>

Schlecker, C., Praetorius, M., Brough, D. E., Presler, R. G., Jr, Hsu, C., Plinkert, P. K., & Staecker, H. (2011). Selective atonal gene delivery improves balance function in a mouse model of vestibular disease. *Gene therapy*, 18(9), 884–890. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.33>

Schmitz, F., Königstorfer, A., & Südhof, T. C. (2000). RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron*, 28(3), 857–872. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00159-8)

Searle, J., Lawson, T. A., Abbott, P. J., Harmon, B., & Kerr, J. F. (1975). An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *The Journal of pathology*, 116(3), 129–138. <https://doi.org/10.1002/path.1711160302>

Sedó Cabezón, L. (2014). Estudi d'un Model d'Exposició Subcrònica a IDPN en la Rata: Patologia Vestibular i Reparació (Tesis doctoral, Universitat de Barcelona).

Sedó-Cabezón, L., Boadas-Vaello, P., Soler-Martín, C., & Llorens, J. (2014). Vestibular damage in chronic ototoxicity: a mini-review. *Neurotoxicology*, 43, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.009>

Sedó-Cabezón, L., Jedynak, P., Boadas-Vaello, P., & Llorens, J. (2015). Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Disease models & mechanisms*, 8(10), 1323–1337. <https://doi.org/10.1242/dmm.021436>

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(2), 258–271. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01552-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01552-8)

Seoane, A., Demêmes, D., & Llorens, J. (2001). Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *The Journal of comparative neurology*, 439(4), 385–399. <https://doi.org/10.1002/cne.1357>

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(4), 339–348. <https://doi.org/10.1007/s004010100387>

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 neuropathologica*, 106(5), 458–470. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0744-8>

Serra, A., Salame, K., Liao, K., & Leigh, R. J. (2013). Eye movements, vision, and the vestibulo-ocular reflexes. *Oxford textbook of vertigo and imbalance*. Oxford University Press, Oxford, 27–33.

Sha, S. H., Qiu, J. H., & Schacht, J. (2006). Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *The New England journal of medicine*, 354(17), 1856–1857. <https://doi.org/10.1056/NEJMc053428>

Sheppard, W. M., Wanamaker, H. H., Pack, A., Yamamoto, S., & Slepecky, N. (2004). Direct round window application of gentamicin with varying delivery vehicles: a comparison of ototoxicity. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of*

Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 131(6), 890–896.
<https://doi.org/10.1016/j.otohns.2004.05.021>

Shi, F., Kempfle, J. S., & Edge, A. S. (2012). Wnt-responsive Lgr5-expressing stem cells are hair cell progenitors in the cochlea. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(28), 9639–9648. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1064-12.2012>

Simmers J. (2012). Motor control: learning new moves with old pumps. *Current biology: CB*, 22(6), R194–R196. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.018>

Soler-Martín, C., Díez-Padriza, 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: an official journal of the Society of Toxicology*, 96(1), 123–132. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl186>

Soler-Martín, C., Boadas-Vaello, P., Saldaña-Ruíz, S., Cutillas, B., & Llorens, J. (2011). Butenenitriles have low axonopathic potential in the rat. *Toxicology letters*, 200(3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.014>

Soler-Martín, C., Vilardosa, U., Saldaña-Ruíz, S., Garcia, N., & Llorens, J. (2012). Loss of neurofilaments in the neuromuscular junction in a rat model of proximal axonopathy. *Neuropathology and applied neurobiology*, 38(1), 61–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01178.x>

Sousa, A. D., Andrade, L. R., Salles, F. T., Pillai, A. M., Buttermore, E. D., Bhat, M. A., & Kachar, B. (2009). The septate junction protein caspr is required for structural support and retention of KCNQ4 at calyceal synapses of vestibular hair cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(10), 3103–3108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4868-08.2009>

Spitzmaul, G., Tolosa, L., Winkelmann, B. H., Heidenreich, M., Frens, M. A., Chabbert, C., de Zeeuw, C. I., & Jentsch, T. J. (2013). Vestibular role of KCNQ4 and KCNQ5 K⁺ channels revealed by mouse models. *The Journal of biological chemistry*, 288(13), 9334–9344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433383>

Stahl, J. S., van Alphen, A. M., & De Zeeuw, C. I. (2000). A comparison of video and magnetic search coil recordings of mouse eye movements. *Journal of neuroscience methods*, 99(1-2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(00\)00218-1](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(00)00218-1)

Stappenbeck, T. S., Wong, M. H., Saam, J. R., Mysorekar, I. U., & Gordon, J. I. (1998). Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Current opinion in cell biology*, 10(6), 702–709. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80110-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80110-5)

Stathakis, D. G., Hoover, K. B., You, Z., & Bryant, P. J. (1997). Human postsynaptic density-95 (PSD95): location of the gene (DLG4) and possible function in nonneural as well as in neural tissues. *Genomics*, 44(1), 71–82. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4848>

Sterling P. (1998). "Knocking out" a neural circuit. *Neuron*, 21(4), 643–644. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80574-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80574-7)

Stone, J. S., & Cotanche, D. A. (2007). Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *The International journal of developmental biology*, 51(6-7), 633–647. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072408js>

Sturdy, A., Goodman, A., José, R. J., Loyse, A., O'Donoghue, M., Kon, O. M., Dedicat, M. J., Harrison, T. S., John, L., Lipman, M., & Cooke, G. S. (2011). Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) treatment in the UK: a study of injectable use and toxicity in practice. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(8), 1815–1820. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr221>

Sultemeier, D. R., & Hoffman, L. F. (2017). Partial Aminoglycoside Lesions in Vestibular Epithelia Reveal Broad Sensory Dysfunction Associated with Modest Hair Cell Loss and Afferent Calyx Retraction. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 331. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00331>

T

Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2001). Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(22), RC182. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-22-j0002.2001>

Takemoto-Kimura, S., Ageta-Ishihara, N., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Mano, T., Okamura, M., Fujii, H., Fuse, T., Hoshino, M., Suzuki, S., Kojima, M., Mishina, M., Okuno, H., & Bito, H. (2007). Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma. *Neuron*, 54(5), 755–770. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.021>

Tanii, H., Hayashi, M., & Hashimoto, K. (1989). Nitrile-induced behavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology*, 10(2), 157–165.

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(1), 64–67. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(89\)90186-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(89)90186-6)

Tanyeri, H., Lopez, I., & Honrubia, V. (1995). Histological evidence for hair cell regeneration after ototoxic cell destruction with local application of gentamicin in the chinchilla crista ampullaris. *Hearing research*, 89(1-2), 194–202. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(95\)00137-7](https://doi.org/10.1016/0378-5955(95)00137-7)

Thuillier, J., & Burger, A. (1954). Contribution a l'étude du syndrome moteur provoqué chez la souris par l' amino-dipropionitrile (souris tournantes) [Contribution to the study of the motor syndrome produced by aminodipropionitrile in mice]. *Experientia*, 10(5), 223–224. <https://doi.org/10.1007/BF02159284>

tom Dieck, S., Altmann, W. D., Kessels, M. M., Qualmann, B., Regus, H., Brauner, D., Fejtová, A., Bracko, O., Gundelfinger, E. D., & Brandstätter, J. H. (2005). Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *The Journal of cell biology*, 168(5), 825–836. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408157>

Ton, C., & Parnig, C. (2005). The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hearing research*, 208(1-2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.05.005>

Tritsch, N. X., Yi, E., Gale, J. E., Glowatzki, E., & Bergles, D. E. (2007). The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature*, 450(7166), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature06233>

Turnidge J. (2003). Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infectious disease clinics of North America*, 17(3), 503–v. [https://doi.org/10.1016/s0891-5520\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(03)00057-6)

Tylleskär, T., Banea, M., Bikangi, N., Cooke, R. D., Poulter, N. H., & Rosling, H. (1992). Cassava cyanogens and konzo, an upper motoneuron disease found in Africa. *Lancet (London, England)*, 339(8787), 208–211. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)90006-o](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90006-o)

V

Vignaux, G., Besnard, S., Denise, P., & Elefteriou, F. (2015). The Vestibular System: A Newly Identified Regulator of Bone Homeostasis Acting Through the Sympathetic Nervous System. *Current osteoporosis reports*, 13(4), 198–205. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0271-2>

Vu, A. A., Nadaraja, G. S., Huth, M. E., Luk, L., Kim, J., Chai, R., Ricci, A. J., & Cheng, A. G. (2013). Integrity and regeneration of mechanotransduction machinery regulate aminoglycoside entry and sensory cell death. *PloS one*, 8(1), e54794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054794>

W

Wang, T., Chai, R., Kim, G. S., Pham, N., Jansson, L., Nguyen, D. H., Kuo, B., May, L. A., Zuo, J., Cunningham, L. L., & Cheng, A. G. (2015). Lgr5+ cells regenerate hair cells via proliferation and direct transdifferentiation in damaged neonatal mouse utricle. *Nature communications*, 6, 6613. <https://doi.org/10.1038/ncomms7613>

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

Wang, Y. J., & Kaestner, K. H. (2019). Single-Cell RNA-Seq of the Pancreatic Islets--a Promise Not yet Fulfilled? *Cell metabolism*, 29(3), 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.016>

Wangemann P. (2006). Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *The Journal of physiology*, 576(Pt 1), 11–21. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112888>

Warchol, M. E., Lambert, P. R., Goldstein, B. J., Forge, A., & Corwin, J. T. (1993). Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5101), 1619–1622. <https://doi.org/10.1126/science.8456285>

Warchol, M. E., & Speck, J. D. (2007). Expression of GATA3 and tenascin in the avian vestibular maculae: normative patterns and changes during sensory regeneration. *The Journal of comparative neurology*, 500(4), 646–657. <https://doi.org/10.1002/cne.21153>

Warchol M. E. (2010). Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 18(5), 454–458. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32833e05ec>

Ward, B. K., Agrawal, Y., Hoffman, H. J., Carey, J. P., & Della Santina, C. C. (2013). Prevalence and impact of bilateral vestibular hypofunction: results from the 2008 US National Health Interview Survey. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*, 139(8), 803–810. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.3913>

Wayman, G. A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W. F., Derkach, V., & Soderling, T. R. (2006). Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron*, 50(6), 897–909. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.008>

Wenngren, B. I., & Anniko, M. (1989). Vestibular hair cell pathology in the dancer mouse mutant. *Acta oto-laryngologica*, 107(3-4), 182–190. <https://doi.org/10.3109/00016488909127497>

Wersäll J. (1995). Ototoxic antibiotics: a review. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 519, 26–29. <https://doi.org/10.3109/00016489509121866>

Wilson, V. J., & Yoshida, M. (1968). Vestibulospinal and reticulospinal effects on hindlimb, forelimb, and neck alpha motoneurons of the cat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(3), 836–840. <https://doi.org/10.1073/pnas.60.3.836>

Woods, C., Montcouquiol, M., & Kelley, M. W. (2004). Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nature neuroscience*, 7(12), 1310–1318. <https://doi.org/10.1038/nn1349>

Wu, W. J., Sha, S. H., McLaren, J. D., Kawamoto, K., Raphael, Y., & Schacht, J. (2001). Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hearing research*, 158(1-2), 165–178. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(01\)00303-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(01)00303-3)

Wung, J. K., Perry, G., Kowalski, A., Harris, P. L., Bishop, G. M., Trivedi, M. A., Johnson, S. C., Smith, M. A., Denhardt, D. T., & Atwood, C. S. (2007). Increased expression of the remodeling- and tumorigenic-associated factor osteopontin in pyramidal neurons of the Alzheimer's disease brain. *Current Alzheimer research*, 4(1), 67–72. <https://doi.org/10.2174/156720507779939869>

Wuyts, F. (2008). Principle of the head impulse (thrust) test or Halmagyi head thrust test (HHTT). *B ENT*, 3, 23-26.

Wyllie, A. H. (1987). Apoptosis: cell death under homeostatic control. In *Mechanisms and Models in Toxicology* (pp. 3-10). Springer, Berlin, Heidelberg.

X

Xie, J., Talaska, A. E., & Schacht, J. (2011). New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hearing research*, 281(1-2), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.05.008>

Xu, D., Hopf, C., Reddy, R., Cho, R. W., Guo, L., Lanahan, A., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., O'Brien, R. J., & Worley, P. (2003). Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron*, 39(3), 513–528. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00463-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00463-x)

Y

Yorgason, J. G., Luxford, W., & Kalinec, F. (2011). In vitro and in vivo models of drug ototoxicity: studying the mechanisms of a clinical problem. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 7(12), 1521–1534. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.614231>

Z

Zanazzi, G., & Matthews, G. (2009). The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals. *Molecular neurobiology*, 39(2), 130–148. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8058-z>

Zhang, J., Wang, N., & Xu, A. (2018). Screening of genes associated with inflammatory responses in the endolymphatic sac reveals underlying mechanisms for autoimmune inner ear diseases. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(3), 2460–2470. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6479>

PUBLICACIONES

Physiological assesment of vestibular function and toxicity in humans and animals

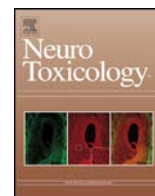
**Jordi Llorens, Angela Callejo, Erin A. Greguske, Alberto F. Maroto, Blanca
Cutillas, Vanessa Martins-Lopes**

NeuroToxicology (2018)



Contents lists available at ScienceDirect

NeuroToxicology



Full Length Article

Physiological assesment of vestibular function and toxicity in humans and animals

Jordi Llorens^{a,b,c,*}, Angela Callejo^a, Erin A. Greguske^{a,b,c}, Alberto F. Maroto^a, Blanca Cutillas^{c,d}, Vanessa Martins-Lopes^a

^a *Departament de Ciències Fisiològiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain*

^b *Institute of Neuroscience, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain*

^c *Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain*

^d *Departament d'Infermeria Fonamental i Medicoquirúrgica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2017

Received in revised form 29 January 2018

Accepted 4 February 2018

Available online xxx

Keywords:

Vestibular system

Physiological methods

Vestibulo-ocular reflex

Vestibulo-spinal reflex

Vestibular-evoked potentials

Equilibrium

Ototoxicity

Humans

Animals

ABSTRACT

Physiological methods that can be similarly recorded in humans and animals have a major role in sensory toxicology, as they provide a bridge between human sensory perception data and the molecular and cellular data obtained in animal studies. Vestibular toxicity research lags well behind other sensory systems in many aspects, including the availability of methods for functional assessment in animals that could be robustly translated to human significance. Here we review the methods available for the assessment of vestibular function in both humans and laboratory animals, with an emphasis on their similarity or divergence, to highlight their potential utility for the predictive assessment of vestibular toxicity.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The vestibular system in the inner ear detects linear and angular accelerations of the head, including gravity and those generated by active and passive body movements and head rotations (Goldberg et al., 2013). Vestibular perception is essentially unconscious in healthy individuals, but its importance is revealed by the dramatic consequences of vestibular dysfunction (Bronstein, 2013). Vestibular loss causes loss of balance and gaze control. Abrupt changes of vestibular function in one labyrinth results in vertigo, dizziness and nausea, and is profoundly disabling. A more frequent condition is a stable but permanent loss of function that has evolved progressively; this results in loss of automatization of balance, loss of image stabilization (decrease of dynamic visual acuity), and loss of automatization of spatial orientation (Bronstein, 2013). Vestibular loss also has large consequences on cognitive, endocrine, and

autonomic nervous system functions. Thus, vestibular dysfunction has been demonstrated to result in reduced bone mass, cardiovascular modifications, circadian rhythm alterations, and impaired cognitive performance (Martin et al., 2016; Besnard et al., 2015; Vignaux et al., 2015). Epidemiological data reveal that vestibular dysfunction contributes to the increased risk of falls in the elderly, and these are a large cause of morbidity and mortality (Agrawal et al., 2009; Ward et al., 2013).

Among the chemicals that are known to cause vestibular toxicity, aminoglycoside antibiotics occupy a prominent place. They are the main cause of human vestibular toxicity, and have received considerable research attention. Anti-malarial drugs, loop diuretics, and cisplatin are additional therapeutic agents known to cause vestibular toxicity (Rybak and Whitworth, 2005; Xie et al., 2011; Schacht et al., 2012; Yorgason et al., 2006; Callejo et al., 2017). These compounds are ototoxic, affecting both the auditory and the vestibular systems. Other ototoxic compounds are found in the workplace as solvents and synthetic intermediates. These include toluene, styrene, trichlorethylene, and cis-2-pentenenitrile (Fechter et al., 1998; Hoet and Lison, 2008; Pouyatos et al., 2002; Saldaña-Ruiz et al., 2012a,b; Campo et al., 2013).

* Corresponding author at: Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain.
E-mail address: jlllorens@ub.edu (J. Llorens).

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.003>

0161-813X/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Physiological assessment has an important role in the study of sensory toxicity. Physiological data from animal studies can often be matched to human data obtained with the same or at least roughly equivalent methodologies. This provides a bridge between the human perception deficits and the histological and molecular observations that can only be obtained in animal models. In the case of the vestibular system, the animal to human comparison is favored by its evolutionary conservation across vertebrates (Day and Fitzpatrick, 2005). However, vestibular assessment presents by itself several difficulties that make the task a challenging one. First, vestibular perception is mostly unconscious and this limits the role of the human subject in the assessment. For visual system assessment, you can ask subjects to order objects according to their graded colors, but it is not obvious how to obtain similarly rich information on the subject's vestibular function. Second, it is difficult to obtain recordings of electrical potentials generated by vestibular signaling. The peripheral vestibular system is very small, containing only a few thousand cells (Desai et al., 2005a,b), and therefore generates electrical potentials that are small (Brown et al., 2017). In addition, cortical areas receiving vestibular information are widespread and poorly defined (Brown et al., 2017), contrary to the well-known and clearly defined somatosensory, visual, and auditory primary cortical areas. Third, it is difficult to study the responses of the system to its natural stimuli, because these include head accelerations, which are not easy to deliver to the subjects, neither humans (Ertl et al., 2017) nor laboratory animals (Jones et al., 2011; Beranek et al., 2012; de Jeu and De Zeeuw, 2012). Nevertheless, several methods are available for the assessment of human vestibular function, and these include recently developed approaches that are transforming the field of vestibular diagnosis in clinical settings (Walther, 2017). Methods to assess vestibular function in animals are also available, including some that are exclusive to laboratory species and others that are equivalent to the ones used in patients.

One important aspect to consider is that many of these methods are indirect, that is, do not measure vestibular function directly, but a motor response that is controlled by vestibular input; typically, these responses will also be influenced by proprioceptive and/or visual input (Serra et al., 2013; Allum and Carpenter, 2013), making it necessary that the vestibular contribution is identified and differentiated from the contribution by other systems. In clinical practice, the functional endpoint (e.g., equilibrium) is usually evaluated for its own clinical relevance and is not followed by an intention to discriminate the underlying functional deficits (Horak et al., 2009).

The aim of this article is to compare the methods used in human clinical practice for the evaluation of vestibular function with the methods available for the evaluation of vestibular function in laboratory animals, with emphasis on their use or suitability to assess vestibular toxicity. Table 1 contains a list of methods used in human and animal studies, which includes references of example studies using them for toxicity evaluation. The final goal is to appraise the translational value of the animal models, and their intrinsic value for objective and quantitative assessment.

2. Vestibular function

As stated previously, the vestibular system detects angular and linear accelerations. To this end, the transducer sensory cells, named hair cells (HCs), are organized in five sensory epithelia in each ear (Fig. 1). Each side of the head contains three cristas in orthogonally oriented semi-circular canals, and two otolith organs, the utricle and saccule. The canals sense angular accelerations whereas the utricle and saccule sense linear accelerations including head tilt (Goldberg et al., 2013). Within the gravitational field of the earth, most head movements combine both rotational and translational components, and the labyrinth in each side of the head will experience different forces depending on the position of

Table 1
Methods for vestibular function assessment, and literature examples of their use to evaluate toxicity.

A. Human	B. Laboratory animals
A.1. Observational and semi-quantitative	B.1. Observational and semi-quantitative
Spontaneous nystagmus (13, 26)	Abnormal spontaneous motor behavior (waltzing syndrome)
Eye response to head impulse	Circling (1) (a)
Caloric nystagmus (2, 10, 11, 15, 37)	Abnormal head movements (head bobbing) (1) (a)
Dynamic visual acuity test (11)	Backward walking (1) (a)
Unterberger-Fukuda stepping test (26)	Ataxia (7)
Romberg test (11, 26)	Swimming deficits (16, 35)
Babinski-Weil test (26)	Head tilt (9)
Bárány's pointing test	Abnormal anti-gravity reflexes
Postural sway	Air-righting reflex (a)
Pointing deviation	Contact-inhibition of the righting reflex (a)
Subjective vertical	Tail-lift reflex (a)
	Vestibular dysfunction test battery (4, 5, 6, 7, 16, 24, 25, 27, 30)
A.2. Quantitative	B.2. Quantitative
VOR assessment	Video-oculography
Electro-nystagmography/-oculography (2, 3, 10, 12, 19, 23, 34, 37)	Spontaneous nystagmus (8)
Scleral search coil technique	Post-rotatory nystagmus (14, 18)
General video-oculography (3)	Direct VOR assessment (32)
video Head Impulse Test (vHIT) (33)	VOR assessment by other techniques (28, 31)
Ocular Vestibular-Evoked Myogenic Potential (oVEMP)	Ocular Vestibular-Evoked Myogenic Potential (oVEMP) (17, 36)
Cervical Vestibular-Evoked Myogenic Potential (cVEMP)	Cervical Vestibular-Evoked Myogenic Potential (cVEMP) (17, 36)
Static posturography	Vestibular evoked potentials (21, 22, 29)
Dynamic posturography (3)	Motor activity (4, 7)
	Inertial measurement of head kinematics (20)

References: (1) Alleva and Balazs, 1978; (2) Barza et al., 1980; (3) Black et al., 2004; (4) Boadas-Vaello et al., 2005; (5) Boadas-Vaello et al., 2007; (6) Boadas-Vaello et al., 2009; (7) Boadas-Vaello et al., 2017; (8) Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013; (9) Horiike et al., 2004; (10) Hoshino et al., 2008; (11) Hydén et al., 1983; (12) Kitsigianis et al., 1988; (13) Kusakari et al., 1981; (14) Larsby et al., 1986; (15) Lerner et al., 1977; (16) Llorens et al., 1993; (17) Lo et al., 2015; (18) Meza et al., 1992; (19) Nordström et al., 1990; (20) Pasquet et al., 2016; (21) Perez et al., 2000; (22) Perez et al., 2013; (23) Pollastrini et al., 1994; (24) Saldaña-Ruiz et al., 2012a,b; (25) Saldaña-Ruiz et al., 2013; (26) Scheenstra et al., 2009; (27) Sedó-Cabezón et al., 2015; (28) Sergi et al., 2003; (29) Sichel et al., 2000; (30) Soler-Martín et al., 2007; (31) Song et al., 1997; (32) Takimoto et al., 2016; (33) Tarnutzer et al., 2016; (34) Tjernström, 1980; (35) Wu et al., 2017; (36) Yang et al., 2010b; (37) Young et al., 2001. (a): Behavior included in the Vestibular dysfunction test battery.

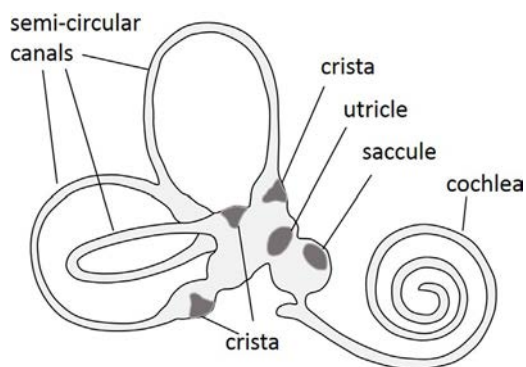


Fig. 1. Schematic drawing of the vestibular system in the mammalian inner ear.

the head (Kingma and Janssen, 2013). The nervous system will extract the information from all the different vestibular epithelia from both sides to correctly interpret the movement, a process in which visual and proprioceptive information are simultaneously taken into account. The sensory information is used for the perception of body position and movement, as well as for automatic motor and gaze control.

Two reflexes control eye position to assure proper vision during movement: the vestibulo-ocular reflex (VOR) and the translational VOR (tVOR) (Serra et al., 2013). The VOR generates a rotational movement of the eyes to stabilize the image in the retina to compensate for the head rotation. During sustained rotation, these eye movements generate nystagmus, a cyclic activity composed of a slow phase that is the result of the VOR, and a quick phase, or resetting saccade, that is generated by the central nervous system and brings the eye back to the initial position to begin a new cycle. The translational VOR (tVOR) produces a slow eye movement that compensates for head translation. Vestibular information is also gathered for the control of body posture and movement (Allum and Carpenter, 2013). This includes a tonic input with a major role in the maintenance of body posture, and dynamic inputs triggering vestibulo-spinal righting reflexes. It must be noted that the neuronal circuits involved in the vestibulo-ocular and vestibulo-spinal reflexes are different, so the functional status in one of these systems may not infer the status of the other. In either case, however, the speed or frequency of the movements constitutes a critical aspect. One subject with impaired vestibular function may be able to use visual information to correct eye position during slow movements, but will fail to do so when the movements are faster (Halmagyi et al., 2017), leading to the loss of visual acuity (Serra et al., 2013). As a general rule, the faster the movement, the larger the role of the vestibular system in generating the body's motor response.

A complete assessment of vestibular function would require the evaluation of the separate function of each of the five sensory epithelia in each side. In clinical practice (Bronstein, 2013), different vestibular pathologies are known that affect only one of the ten vestibular epithelia (e.g. benign paroxysmal positional vertigo), all epithelia in one side only (e.g. acute vestibular failure or Ménière's Disease), only one kind of epithelia (e.g. the otoliths; Curthoys and Manzari, 2013), or the entire vestibular system (e.g. ototoxicity).

3. Vestibular dysfunction in laboratory animals

Three different types of animal models have been used to study vestibular dysfunction. In the first type of models, unilateral surgical lesions or local toxic applications are used to cause permanent (e.g. Callejo et al., 2017) or transient (Gaboyard-Niay

et al., 2016) vestibular deficits to mimic the common human condition of unilateral loss of vestibular function. These studies are used to address the repair capacity of the vestibular epithelia (Gaboyard-Niay et al., 2016) or the central impact of the unilateral deafferentation. This most frequently addresses the phenomenon known as vestibular compensation, which is the recovery in motor behavior observed through time after the unilateral lesion (Liberge et al., 2010). The second type of animal models of vestibular deficiency is that of genetic models, including both spontaneous mutants and genetically modified animals. Some of these animals show complete loss of vestibular function, associated with agenesis of the ear or, most commonly, absent or non-functional hair cells (Cheong and Steel, 2002), while other strains show more restricted deficits. One major example is that of the mouse and rat strains with mutations that hamper the development of the otoconia, such as the head-tilt (*het*^{-/-}) and tilted (*tit*^{-/-}) mice (Jones et al., 1999). These mice have abnormal macular function but intact crista function.

The third type of animal models for experimental vestibular deficiencies is that of animals systemically exposed to ototoxic agents (Llorens et al., 1993; Wu et al., 2001; Boadas-Vaello et al., 2005; Saldaña-Ruiz et al., 2013; Sedó-Cabezón et al., 2015; Takimoto et al., 2016; Boadas-Vaello et al., 2017). The ototoxic insults are typically bilateral, symmetric, and involve the entire vestibular system. However, it has been well established that many compounds that cause vestibular toxicity will display within experimental animals a progression of the damage following a specific sequence: crista > utricle > saccule, and within each epithelium is a progression of damage from central to peripheral parts (Aran et al., 1982; Llorens et al., 1993; Balbuena and Llorens, 2003; Sultemeier and Hoffman, 2017). The difference in sensitivity is partial, and no compound is known that causes complete loss of crista function with intact otolith function. However, a compound that causes complete hair cell loss in the entire vestibule at fully effective doses may cause extensive crista damage associated with intermediate utricle damage and almost intact saccular structure at lower doses.

4. Observational assessment of vestibular function in human clinics

One main approach to assess vestibular function is the evaluation of the VOR, which can be achieved with a variety of tests for bedside examination (Kheradmand et al., 2013). Since the vestibular system provides tonic inputs, loss of function in one side results in an unbalanced input that generates responses that are normally generated only by movement in healthy individuals. Thus, vestibular loss results in the presence of spontaneous nystagmus in the absence of rotational movements. Therefore, examining for the presence of spontaneous nystagmus and their characteristics in a number of conditions provides key information from the patient. The examiner may determine the waveform of nystagmus, its direction, the matching or dissociated pairing in each eye, and the effect of eliminating sight fixation, of eye convergence, and of provocative tests such as the Valsava maneuver or head shaking. The presence of other abnormal eye movements, such as saccadic intrusions, is also noticed. Moreover, these observations can be made using Frenzel goggles, which are fitted with magnifying glasses and an internal light, and eliminate a patient's ability for sight fixation.

A largely direct evaluation of the VOR is provided by the head impulse maneuver (Halmagyi and Curthoys, 1988). The patient is asked to fix on a target, and the examiner quickly turns his head horizontally or vertically from one position to another. The rotation must not be large, but fast. The VOR results in a compensatory eye movement that allow the eyes to remain on the target.

In the caloric testing, cold or warm water is instilled in the external auditory canal (Kheradmand et al., 2013). This causes a change in the temperature of the lateral semicircular canal, which triggers a change in the activity of the crista and results in a nystagmic response. One useful aspect of the caloric test is that it provides specific information on the responsiveness of the horizontal semicircular canal from one single side. When compared to the high-frequency stimulus head impulse test, the caloric test represents a low frequency stimulus that may reveal different vestibular impairments.

The VOR can also be evaluated by techniques like the dynamic visual acuity test, that is, the evaluation of the loss of visual acuity caused by movement of the head (Kheradmand et al., 2013). Because the main function of the VOR is to preserve visual acuity during head movements, individuals with defective vestibular function suffer a much greater loss of acuity during movement than healthy individuals (Schubert et al., 2002).

Unilateral damage involving one semicircular canal or the entire ear can also be evaluated by a number of postural, gait, and equilibrium tests (Kheradmand et al., 2013; Paquet et al., 2014). In the Unterberger-Fukuda stepping test, the patient marches in place with his/her eyes closed; healthy individuals maintain their orientation while a pathological response consists of a deviation towards the deficient vestibule (negative response). In the classic Romberg test, the subject is asked to stand erect with feet together and eyes closed; a deviation towards the deficient side is observed in cases of vestibular dysfunction. In the Babinski-Weil test, the patient repeatedly walks forward and backward with his/her eyes closed; vestibular imbalance results in deviant paths that draw a star. In the Bárány's pointing test, the patient extends his/her arms and index fingers to the front and then closes his/her eyes; a deviation to the damaged side is observed in cases of vestibular dysfunction.

Tests more related to otolith-spinal function include the observation of postural sway, or of pointing deviation when the subject is asked to point with the eyes closed to a previously seen target. The inspection of responses to external perturbations imposed by the examiner (e.g., a gentle push) allows assessing dynamic vestibulospinal function. Some of these tests are used as part of larger batteries designed for the assessment of balance, such as the Balance Evaluation Systems Test (BESTest) (Horak et al., 2009; Mancini and Horak, 2010). Another test to evaluate otolith function is the assessment of the Subjective Visual Vertical (SVV), which measures the angle between the perceptual and true (gravitational) vertical; this can be easily determined by asking the subject to rotate a straight line until he/she judges the line to be in a vertical position in the absence of other visual or positional cues (Zwergal et al., 2009).

The tests listed in this section and other similar tests have great diagnostic interest, but the intrinsic diagnostic and scientific value of most of them are limited by their non-quantitative nature. Therefore, additional methods for a more accurate assessment of vestibular function were developed. Initially used only in laboratory settings, some of them have been gaining much wider distribution.

5. Quantitative assessment of vestibular function in human clinics

The VOR has been measured using a variety of techniques. In the scleral search coil method, eye position is determined by using copper coils that are embedded into contact lenses (Robinson, 1963; Kenyon, 1985). The subject is placed in an alternating magnetic field, which generates induction currents in the coil. Since the currents generated depend on the orientation of the coil with respect to the magnetic field, the eye movements can be

deducted from the currents. This method provides high precision recordings, but has not attained common clinical use due to its complexity. In the electronystagmography, skin electrodes are placed to record the electrical activity of the oculomotor muscles. This quantitative recording system can be used in several different tests described above, such as spontaneous nystagmus, positional triggering, or caloric testing (Shepard et al., 2013).

Another option is to use video-oculography for eye tracking, where video recordings of pupil motion are analyzed to obtain eye rotation data (Stahl et al., 2000). In highly specialized facilities, video-oculographic recordings are obtained while the subjects receive whole-body accelerations in rotational chairs (Shepard et al., 2013). Outside these laboratories, the use of video-oculography techniques has been recently favored by the development of low-cost cameras with increasing frame speed and light sensitivity, and computer-based methods for real time analysis. Of the highest interest is the great impact that the development of the video head impulse test (vHIT) is having in the field. In the vHIT (MacDougall et al., 2009; Halmagyi et al., 2017), the head impulse test is performed in patients wearing tight-fitting goggles equipped with a high-speed camera and head velocity sensors. Specific software obtains accurate objective measures of the head and eye velocity. The vHIT test provides precise and quantitative information on the function of each one of the six semicircular canals. Due to its unprecedented diagnostic value, and the availability of user-friendly commercial versions, the vHIT test is being adopted in most vestibular clinics, where it is gaining status as a "gold standard" for vestibular evaluation. One key reason for this success is that the test has demonstrated it is a purely vestibular test as long as the head turn is passive, unpredictable, and fast ($>150^\circ/s$). With these high angular accelerations, which occur during normal head movements, other oculomotor control systems (such as smooth pursuit, optokinetic, cervico-ocular reflex) do not operate to modify the faster VOR (Halmagyi et al., 2017).

To evaluate otolith function, two different myogenic potentials have been characterized (Curthoys et al., 2012; Curthoys et al., 2014; Colebatch et al., 2016). The ocular vestibular-evoked myogenic potential (oVEMP) is recorded by surface electromyography electrodes to measure the activity of the contralateral inferior oblique muscle of the eye in response to either a bone conducted vibration of the head or an air conducted sound. Although sound perception is a function of the cochlea, it has been well known that the otolith organs are responsive to certain auditory stimuli. Cumulating evidence indicates that oVEMPs specifically reflect utricular output. In contrast, another myogenic potential, the cervical VEMP (cVEMP), specifically reflects saccular function. The cVEMP is recorded in the ipsilateral sternocleidomastoid muscle in response to loud sounds.

One theoretically feasible approach to vestibular evaluation would be the use of electrovestibulography, i.e., recording of the electrical activity generated by the peripheral vestibular system. However, this approach is challenging because of the difficulties for an effective and specific stimulation of the vestibular system, and the difficulties in recording and isolating the small potentials generated by the labyrinth (Brown et al., 2017). The scarce studies evaluating evoked potentials in the skull of humans stimulated by body accelerations reported small potentials, most likely of central (not peripheral) origin, and supportive of the theory that vestibular information is processed in spatially distributed central pathways, rather than at a focal cortical region (Brown et al., 2017). Local (ear) recordings have also been largely unsuccessful.

The assessment of postural control, mostly related to vestibulospinal function, is also performed using a variety of laboratory devices. These include systems for quantitative posturography, which can be used with a variety of protocols that are oriented to

measure different endpoints. Both static posturography and dynamic posturography can be evaluated using protocols designed to evaluate the impact of different sensory inputs on body sway to infer the contribution of the visual, somatosensory, and vestibular systems on the clinical condition under study (Shepard et al., 2013; Mancini and Horak, 2010). Alternative to posturography devices are wearable inertial sensors for the continuous recording of mobility in a specific location of the body. These sensors show great promise because of their small size and cost, and their increased reliability, robustness, and capability for data collection, storage, and transfer. However, their effective use to provide specific vestibular measurements awaits further development (Mancini and Horak 2010).

Taken together, the variety of tests available provides rich information on vestibular functions. However, there are still limitations with respect to the final desired goal: specific tests that provide good measures of specific parameters of vestibular physiology, and are simultaneously predictive of specific functional deficits suffered by the patients in their daily life.

6. Vestibular assessment of human toxicity

Few published studies have reported the use of vestibular function tests to evaluate existent or potential vestibular toxicity in humans. The most studied subject has been aminoglycoside antibiotic toxicity (Black et al. 2004; Barza et al., 1980; Lerner et al., 1977; Nordström et al., 1990; Scheenstra et al., 2009; Tarnutzer et al., 2016; Tjernström, 1980). Studies addressing other issues include the assessment of the vestibular toxicity of the chemotherapeutic agent cisplatin (Kitsigianis et al., 1988) and the vestibular dysfunction shown by hemodialysis patients. Dysfunction is suggested to be caused by previous treatment with aminoglycoside antibiotics and loop diuretics (Kusakari et al., 1981). There are also reports evaluating the vestibular toxicity of workplace chemicals, including the solvent benzene (Pollastrini et al., 1994), organophosphate pesticides (Hoshino et al., 2008), and hair curling solutions (Young et al., 2001).

In addition to the study of vestibular toxicity, the VOR has also been used to study central nervous system effects of chemicals, such as toluene (Hydén et al., 1983) and organoarsenic compounds (Nakamagoe et al., 2013).

7. Observational assessment of vestibular dysfunction in animal studies

Animals with a complete or profound vestibular deficit are easily identified by their overt postural, movement, and reflex abnormalities. These alterations are similarly observed in vestibular deficiency of genetic (Demêmes and Sans, 1985; Wenngren and Anniko, 1989; Kaiser et al., 2001) or toxic (Llorens et al., 1993; Soler-Martín et al., 2007; Saldaña-Ruiz et al., 2012a,b) origin. Rats and mice show spontaneous stereotyped circling (tail-chasing locomotion), exaggerated up and down movements of the head (head bobbing) including episodes of extreme backward extension of the neck, and retropulsion or backward displacement of the animal. Usually, the animals are also hyperactive and so the syndrome becomes very prominent, although strain-dependent exceptions exist (Boadas-Vaello et al., 2017). Based on these abnormalities in spontaneous motor behavior, mutant strains with vestibular deficits have been named “waltzer”, “dancer”, “shaker”, “circler”, “whirler” or “stargazer” (e.g. Demêmes and Sans, 1985; Wenngren and Anniko, 1989; Schirmer et al., 2007). The vestibular deficient rodents also show reduced or absent righting activity in the open field, an inability to swim, and ataxia (Gray et al., 1988; Ossenkopp et al., 1990; Llorens et al., 1993; Boadas-Vaello et al., 2005; Boadas-Vaello et al., 2017). Abnormal reflex activities

include loss of righting reflexes in many different situations. In the classic air-right test, the rodent is allowed to fall from a supine position onto a foam pad, and its ability to right itself in the air during the fall, which is strongly dependent on vestibular function, is observed (Ossenkopp et al., 1990; Shoham et al., 1989). In the contact test, the contact of a surface with the paws is sufficient to inhibit the righting response of a vestibular-deficient rodent placed supine on a table top (Shoham et al., 1989); so, the animal stays supine and “walks” on the top surface. In the tail-lift test, healthy rodents extend the body and fore paws in a landing reflex, while vestibular deficient animals curl their bodies ventrally (Hunt et al., 1987; Llorens et al., 1993). Not only in rodents have postural abnormalities and abnormal reflexes been described and used to identify vestibular dysfunction, but also in a large variety of other species, including cats, dogs, guinea pigs, birds, and frogs (Thomas, 1940; Soler-Martín et al., 2007).

While the overt abnormalities in spontaneous and reflex behaviors have made possible the identification of vestibular-deficient animals, their use as a source of quantitative measurements of the deficiency has been scarce. Frequently, the simple presence of some of these signs has been used only to corroborate the existence of the expected deficiency in the mutant or lesioned animals (Russell et al., 2003). In other cases, some of these items have been evaluated by a rating scale, usually as 0 to 2 or 0 to 3 (Wallace et al., 2002). A more systematic approach has been used to obtain a semi-quantitative evaluation by adding the rating scores from several different tests to calculate a total composite score. Our laboratory uses a battery of six items rated 0 to 4 to obtain a vestibular dysfunction score of 0–24 in rats (Boadas-Vaello et al., 2005) and mice (Soler-Martín et al., 2007). This test battery was established as a modified version of the battery initially developed to evaluate the vestibular toxicity of IDPN in rats (Llorens et al., 1993), following previous tests of IDPN toxicity (Selye, 1957; Diamond et al., 1982; Crofton and Knight, 1991), and similar tests of bilabyrinthectomy effects (Ossenkopp et al., 1990; Shoham et al., 1989; Hunt et al., 1987). This battery has been successful in assessing dose-dependent vestibular toxicity, most notably following nitrile exposure (Llorens et al., 1993; Llorens et al., 1998; Balbuena and Llorens, 2001, 2003; Boadas-Vaello et al., 2005; Saldaña-Ruiz et al., 2012a, 2012b, 2013). The battery has been validated by surgical (Llorens et al., 1993) and chemical labyrinthectomy procedures (Llorens and Rodríguez-Farré, 1997), and successfully used in other laboratories (e.g., Luxa et al., 2013). Modified versions of this test battery have been used to assess the effects of unilateral lesions (Vignaux et al., 2012; Gaboyard-Niy et al., 2016).

The observational measurements just explained are suitable for the detection and dose-response assessment of vestibular toxicity in laboratory animals, but suffer from two main limitations. First, they lack a full quantitative character. Second, they have no established relationship to the human clinical signs. Balance and motor behavior are very different between the quadruped animals and the biped humans; the meaning in translational terms of a simple reflex, like the tail-lift reflex as a single example, has not been established.

8. Quantitative measures of vestibular dysfunction in animal studies

8.1. Recording of eye movements

As in humans, vestibular dysfunction is expressed as altered eye movements, including alterations in nystagmus and vestibulo-ocular reflex. The more precise and accurate methods to record eye movements are the scleral search coil and video-oculography systems (see Section 5), but other methods, such as light reflection

and observational approaches, have also been used (Sergi et al., 2003; Song et al., 1997). In rodents, the search coil method is invasive, since the coil must be surgically implanted into the sclera of the eye (Quinn et al., 1998). The surgical procedure can be challenging in small species and it can interfere with normal eye movement (Stahl et al., 2000). To our knowledge, this technique has not been applied to toxicity studies. Previously, the search coil offered a much greater sampling rate than video-oculography, but this advantage no longer exists due to the great success in enhancing the temporal resolution of video-oculography (Imai et al., 2016). As in human clinics, the availability of high-speed and sensitive cameras at low costs is favoring the use of video-oculography over other possible approaches. Nevertheless, video-oculography is far from optimal, since a head fixation marker must be implanted onto the skull in order to place the animal with respect to the camera (Imai et al., 2016; Beraneck et al., 2012), and therefore, head-free experiments are impossible with this method.

Following unilateral damage, rats and mice show a conspicuous spontaneous nystagmus, equivalent to that found in clinical observations. Spontaneous nystagmus has been successfully measured to follow the evolution of the vestibular function after an intratympanic toxic insult (Dyhrfeld-Johnsen et al., 2013). Another approach has been the measure of post-rotatory nystagmus. The VOR generating the rotatory nystagmus depends on the inertial displacement of the endolymph (the intralabyrinth fluid) with respect to the hair cells in the vestibular epithelia rotating with the body. After a period of time, the endolymph will be rotating at the same angular speed as the rest of the body, and it will keep this inertial movement if the body rotation is terminated. This will cause the stimulation of the hair cells, thus generating the post-rotatory nystagmus in the sense opposite to the sense of the initial VOR. Therefore, quantitative assessment of this post-rotatory nystagmus (duration, frequency) has been used to evaluate the vestibular system. A few examples are available on the use of this method in neurotoxicology research (e.g., Larsby et al., 1986).

More precise assessment of the vestibular function can be obtained from the direct measure of the VOR reflex. Although several laboratories can record the VOR in mice (Beraneck et al., 2012; de Jeu and De Zeeuw, 2012; Luebke et al., 2014; Imai et al., 2016), data on ototoxic effects are scarce (Takimoto et al., 2016), likely owing to the difficulties associated with the measure, which is technically complex and invasive.

8.2. Electrical recordings

The oVEMPs and cVEMPs described previously and used in human clinics have also been used in animal research, in most cases using guinea pigs. As in humans, evidences indicate that oVEMPS reflect utricular function and cVEMPS reflect saccular function (Yang et al., 2010a; Curthoys et al., 2012). A few examples are available on their use to study ototoxicity (Yang et al., 2010b; Lo et al., 2015).

Vestibular evoked potentials have been recorded in several mammalian species, including rats, mice, guinea pigs, gerbils, sand rats, and cats, but in only a very small number of laboratories (Jones and Jones, 1999; Jones et al., 2011; Perez et al., 2013; Elidan et al., 1987; King et al., 2017). In toxicology, the technique has been used to examine the potential ototoxicity of topically administered medications (Perez et al., 2013; Perez et al., 2000; Sichel et al., 2000), and the ototoxic effect of middle-ear injection of gentamicin (King et al., 2017).

8.3. Motor behavior

Quite frequently, articles dealing with animals with defective vestibular function present quantitative data using tests of motor

function that are sensitive but not specific to vestibular effects. For instance, vestibular dysfunction associates with impaired rotarod performance (Schlecker et al., 2011), as well as with increased locomotor activity in most but not all cases (Boadas-Vaello et al., 2017).

Nowadays, other measures are being developed that are sensitive to both vestibular and non-vestibular deficits, but that are more robustly interpreted in terms of vestibular function. Thus, Pasquet et al. (2016) reported on a system for the inertial measurement of head kinematics in rats that was found suitable to measure the postural abnormalities that follows unilateral vestibular lesions, and the postural recovery associated with subsequent vestibular compensation.

9. Translational aspects of vestibular assessment

In both human clinics (Bronstein, 2013) and animal studies (Boadas-Vaello et al., 2005; Saldaña-Ruiz et al., 2013) there are several observational diagnostic tools for the detection and gross evaluation of overt vestibular loss. Nevertheless, diagnosis of vestibular diseases is not yet a trivial issue in general practice (Lewis, 2015). Likewise, detection of vestibular dysfunction is not specifically addressed in either the Functional Observational Battery for neurotoxicity screening (Moser, 2011), or in routine safety pharmacology studies (Cavero and Holzgrefe, 2017). At this level, major differences exist between the human and animal settings. Although a deep bilateral loss of vestibular function profoundly affects motor competences in humans, it does not cause a syndrome comparable to the waltzing syndrome that characterizes a similar loss in laboratory rodents. Also, the knowledge of the relationships between each symptom and a specific pathology remains very limited, in both humans and rodents.

In more detailed studies, several measures have been developed in both humans and animals that provide selective evaluation of specific vestibular functions. Thus, video-oculography approaches provide accurate measures of the VOR reflexes that result from equivalent vestibular sub-systems and neural pathways in humans and rodents. However, significant differences exist. In humans, the vHIT has emerged as an easy to obtain and robust measure of semi-circular canal function that is gaining wide use in clinical practice. In contrast, the measure of the VOR in the mouse remains a method available to very few laboratories. Moreover, while vHITs use high angular accelerations (Halmagyi et al., 2017), rodent VOR studies use significantly lower accelerations (Imai et al., 2016), and the reflexes at these different accelerations may rely on different vestibular sub-systems.

An area where a significant match is being attained is that of the oVEMPS and cVEMPS. These reflexes are being similarly recorded in humans and laboratory animals and, importantly, their vestibular and neural bases are being established (Curthoys et al., 2012; Curthoys et al., 2014). Also important is the fact that they provide information on utricular and saccular function that are not evaluated by the VOR measures. Therefore, their use in toxicological assessment (Yang et al., 2010b; Lo et al., 2015) bears significant translational value. In contrast to these electromyographic models, other methodologies that are important for other sensory systems, such as the sensory evoked potentials, have scarce translational impact in vestibular research. While they have been used in a few animal toxicity studies (Perez et al., 2013; Perez et al., 2000; Sichel et al., 2000), the methodological development for human assessment is still insufficient (Ertl et al., 2017).

A small number of studies are devoted to the evaluation of vestibular function with regard to its role in body posture and equilibrium, and these frequently suffer from a limited specificity, in both humans and animals. However, the constantly increased

availability of smaller and less expensive devices for posture and movement analysis (Mancini and Horak 2010; Pasquet et al., 2016) make it likely that important developments in this area will appear in the next few years.

10. Conclusion

The increased recognition of the critical role of the vestibular system in wellbeing is nowadays driving a development of new methodologies for human vestibular evaluation which is favored by the increased availability of the necessary technical tools, such as the high-speed video and computer tools that have made possible the development of the vHIT test. The same technical advancements should make possible the development of new animal tests that easily and reliably measure vestibular function, to be used in vestibular toxicity assessment and its human translation.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain) / European Regional Development Fund (European Union) [BFU2015-66109-R (MINECO/FEDER, UE)]; and by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Catalonia) [2014 SGR 943]. E.G. is recipient of a FPU fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (Spain).

References

- Agrawal, Y., Carey, J.P., Della Santina, C.C., Schubert, M.C., Minor, L.B., 2009. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the national health and nutrition examination survey, 2001–2004. *Arch. Intern. Med.* 169, 938–944. Erratum in: *Arch. Intern. Med.* 2009; 169:1419.
- Alleva, F.R., Balazs, T., 1978. Toxic effects of postnatal administration of streptomycin sulfate to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 855–859.
- Allum, J.H.J., Carpenter, M.G., 2013. Postural control and the vestibulospinal system. In: Bronstein, A.M. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 35–48.
- Aran, J.M., Erre, J.P., 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.* 390, 1–30.
- Balbuena, E., Llorens, J., 2001. Behavioral disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res.* 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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187, 89–100.
- Barza, M., Lauerma, M.W., Tally, F.P., Gorbach, S.L., 1980. Prospective, randomized trial of netilmicin and amikacin, with emphasis on eighth-nerve toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17, 707–714.
- Beranek, M., Bojados, M., Le Séac'h, A., Jamon, M., Vidal, P.P., 2012. Ontogeny of mouse vestibulo-ocular reflex following genetic or environmental alteration of gravity sensing. *PLoS One* 7, e40414.
- Besnard, S., Lopez, C., Brandt, T., Denise, P., Smith, P.F., 2015. Editorial: the vestibular system in cognitive and memory processes in mammals. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 55.
- Black, F.O., Pesznecker, S., Stallings, V., 2004. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otol. Neurotol.* 25, 559–569.
- 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., Díez-Padriza, N., Bayona, J.M., Llorens, J., et al., 2007. Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of cis-crotonitrile in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (225), 310–317.
- 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. *Toxicol. Sci.* 107, 461–472.
- Boadas-Vaello, P., Sedó-Cabezón, L., Verdú, E., Llorens, J., 2017. Strain and sex differences in the vestibular and systemic toxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in mice. *Toxicol. Sci.* 156, 109–122.
- Bronstein, A.M., 2013. In: Bronstein, A.M. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press.
- Brown, D.J., Pastras, C.J., Curthoys, I.S., 2017. Electrophysiological measurements of peripheral vestibular function—A review of electrovestibulography. *Front. Syst. Neurosci.* 11, 34.
- Callejo, A., Durochat, A., Bressieux, S., Saleur, A., Chabbert, C., Domènech Juan, I., Llorens, J., Gaboyard-Niay, S., 2017. Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat. *Neurotoxicology* 60, 1–9.
- Campo, P., Morata, T.C., Hong, O.S., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis. Mon.* 59, 119–138.
- Cavero, I., Holzgrefe, H., 2017. 15th annual meeting of the safety pharmacology society: focus on traditional sensory systems. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 83, 55–71.
- Cheong, M.A., Steel, K.P., 2002. Early development and degeneration of vestibular hair cells in bronx waltzer mutant mice. *Hear. Res.* 164, 179–189.
- Colebatch, J.G., Rosengren, S.M., Welgampola, M.S., 2016. Vestibular-evoked myogenic potentials. *Handb. Clin. Neurol.* 137, 133–155.
- Crofton, K.M., Knight, T., 1991. Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 575–581.
- Curthoys, I.S., Manzari, L., 2013. Otolithic disease: clinical features and the role of vestibular evoked myogenic potentials. *Semin. Neurol.* 33, 231–237.
- Curthoys, I.S., Vulovic, V., Burgess, A.M., Manzari, L., Sokolic, L., Pogson, J., Robins, M., Mezey, L.E., Goonetilleke, S., Cornell, E.D., MacDougall, H.G., 2014. Neural basis of new clinical vestibular tests: otolith neural responses to sound and vibration. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41, 371–380.
- Curthoys, I.S., Vulovic, V., Manzari, L., 2012. Ocular vestibular-evoked myogenic potential (oVEMP) to test utricular function: neural and oculomotor evidence. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 32, 41–45.
- Day, B.L., Fitzpatrick, R.C., 2005. The vestibular system. *Curr. Biol.* 15, R583–R586.
- de Jeu, M., De Zeeuw, C.I., 2012. Video-oculography in mice. *J. Vis. Exp.* 65, e3971.
- Demêmes, D., Sans, A., 1985. Pathological changes during the development of the vestibular sensory and ganglion cells of the Bronx waltzer mouse. Scanning and transmission electron microscopy. *Brain Res.* 350, 285–295.
- Desai, S.S., Zeh, C., Lysakowski, A., 2005a. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Sacculus and utricular maculae. *J. Neurophysiol.* 93, 251–266.
- Desai, S.S., Ali, H., Lysakowski, A., 2005b. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares. *J. Neurophysiol.* 93, 267–280.
- Diamond, B.I., Reyes, M.G., Borison, R., 1982. A new animal model for Tourette syndrome. *Adv. Neurol.* 35, 221–225.
- Dyhrfeld-Johnsen, J., Gaboyard-Niay, S., Broussy, A., Saleur, A., Brugeaud, A., Chabbert, C., 2013. Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. *J. Vestib. Res.* 23, 177–186.
- Elidan, J., Lin, J., Honrubia, V., 1987. Vestibular ototoxicity of gentamicin assessed by the recording of a short latency vestibular evoked response in cats. *Laryngoscope* 97, 865–870.
- Ertl, M., Moser, M., Boegle, R., Conrad, J., Zu Eulenburg, P., Dieterich, M., 2017. The cortical spatiotemporal correlate of otolith stimulation: vestibular evoked potentials by body translations. *Neuroimage* 155, 50–59.
- Fechter, L.D., Liu, Y., Herr, D.W., Crofton, K.M., 1998. Trichloroethylene ototoxicity: evidence for a cochlear origin. *Toxicol. Sci.* 42, 28–35.
- Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Saleur, A., Broussy, A., Brugeaud, A., Chabbert, C., 2016. Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: a rat model of vertigo symptoms. *Dis. Model. Mech.* 9, 1181–1192.
- Goldberg, M.E., Walker, M.F., Hudspeth, A.J., 2013. The vestibular system. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. (Eds.), *Principles of Neural Sciences*. McGraw-Hill Companies, New York, USA, pp. 917–934.
- Gray Jr., L.E., Rogers, J.M., Ostby, J.S., Kavlock, R.J., Ferrell, J.M., 1988. Prenatal dinocap exposure alters swimming behavior in mice due to complete otolith agenesis in the inner ear. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92, 266–273.
- Halmagyi, G.M., Chen, L., MacDougall, H.G., Weber, K.P., McGarvie, L.A., Curthoys, I.S., 2017. The video head impulse test. *Front. Neurol.* 8, 258.
- Halmagyi, G.M., Curthoys, I.S., 1988. A clinical sign of canal paresis. *Arch. Neurol.* 45, 737–739.
- Hoet, P., Lison, D., 2008. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 127–170.
- Horak, F.B., Wrisley, D.M., Frank, J., 2009. The balance evaluation systems test (BESTest) to differentiate balance deficits. *Phys. Ther.* 89, 484–498.
- Horiike, O., Shimogori, H., Yamashita, H., 2004. Effect of edaravone on streptomycin-induced vestibulotoxicity in the guinea pig. *Laryngoscope* 114, 1630–1632.
- Hoshino, A.C., Pacheco-Ferreira, H., Taguchi, C.K., Tomita, S., Miranda M de, F., 2008. Ototoxicity study in workers exposed to organophosphate. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 74, 912–918.
- Hunt, M.A., Miller, S.W., Nielson, H.C., Horn, K.M., 1987. Intratympanic injections of sodium arsanilate (atoxil) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav. Neurosci.* 101, 427–428.
- Hydén, D., Larsby, B., Andersson, H., Odqvist, L.M., Liedgren, S.R., Tham, R., 1983. Impairment of visuo-vestibular interaction in humans exposed to toluene. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 45, 262–269.
- Imai, T., Takimoto, Y., Takeda, N., Uno, A., Inohara, H., Shimada, S., 2016. High-speed video-oculography for measuring three-dimensional rotation vectors of eye movements in mice. *PLoS One* 11, e0152307.
- Jones, T.A., Jones, S.M., 1999. Short latency compound action potentials from mammalian gravity receptor organs. *Hear. Res.* 136, 75–85.

- Jones, S.M., Erway, L.C., Bergstrom, R.A., Schimenti, J.C., Jones, T.A., 1999. Vestibular responses to linear acceleration are absent in otoconia-deficient C57BL/6J*Ei-het* mice. *Hear. Res.* 135, 56–60.
- Jones, T.A., Jones, S.M., Vijayakumar, S., Brugeaud, A., Bothwell, M., Chabbert, C., 2011. The adequate stimulus for mammalian linear vestibular evoked potentials (VsEPs). *Hear. Res.* 280, 133–140.
- Kaiser, A., Fedrowitz, M., Ebert, U., Zimmermann, E., Hedrich, H.J., Wedekind, D., Löscher, W., 2001. Auditory and vestibular defects in the circling (*ci2*) rat mutant. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1129–1142.
- Kenyon, R.V., 1985. A soft contact lens search coil for measuring eye movements. *Vis. Res.* 25, 1629–1633.
- Kheradmand, A., Bronstein, A., Zee, D.S., 2013. Clinical bedside examination. In: Bronstein, A.M. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 123–136.
- King, E.B., Shepherd, R.K., Brown, D.J., Fallon, J.B., 2017. Gentamicin applied to the oval window suppresses vestibular function in Guinea pigs. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 18, 291–299.
- Kingma, H., Janssen, M., 2013. Biophysics of the vestibular system. In: Bronstein, A. M. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 1–13.
- Kitsigianis, G.A., O'Leary, D.P., Davis, L.L., 1988. Active head-movement analysis of cisplatin-induced vestibulotoxicity. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 98, 82–87.
- Kusakari, J., Kobayashi, T., Rokugo, M., Arakawa, E., Ohyama, K., Kawamoto, K., Sekino, H., 1981. The inner ear dysfunction in hemodialysis patients. *Tohoku J. Exp. Med.* 135, 359–369.
- Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Odkvist, L.M., 1986. The effect of toluene on the vestibulo- and opto-oculomotor system in rats. A computerized nystagmographic study. *Acta Otolaryngol.* 101, 422–428.
- Lerner, S.A., Seligsohn, R., Matz, G.J., 1977. Comparative clinical studies of ototoxicity and nephrotoxicity of amikacin and gentamicin. *Am. J. Med.* 62, 919–923.
- Lewis, R.F., 2015. Advances in the diagnosis and treatment of vestibular disorders: psychophysics and prosthetics. *J. Neurosci.* 35, 5089–5096.
- Liberge, M., Manrique, C., Bernard-Demanze, L., Lacour, M., 2010. Changes in TNF α , NF κ B and MnSOD protein in the vestibular nuclei after unilateral vestibular deafferentation. *J. Neuroinflammation* 7, 91.
- Llorens, J., Aguilo, A., Rodríguez-Farré, E., 1998. Behavioral disturbances and vestibular pathology following crotonitrile exposure in rats. *J. Periph. Nerv. Sys.* 3, 189–196.
- 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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123, 199–210.
- Llorens, J., Rodríguez-Farré, E., 1997. Comparison of behavioral, vestibular and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 117–127.
- Lo, W.C., Chang, C.M., Liao, L.J., Wang, C.T., Young, Y.H., Chang, Y.L., Cheng, P.W., 2015. Assessment of D-methionine protecting cisplatin-induced otolith toxicity by vestibular-evoked myogenic potential tests, atpase activities and oxidative state in guinea pigs. *Neurotoxicol. Teratol.* 51, 12–20.
- Luebke, A.E., Holt, J.C., Jordan, P.M., Wong, Y.S., Caldwell, J.S., Cullen, K.E., 2014. Loss of α -calcitonin gene-related peptide (α CGRP) reduces the efficacy of the vestibulo-ocular reflex (VOR). *J. Neurosci.* 34, 10453–10458.
- Luxa, N., Salanova, M., Schiff, G., Gutschmann, M., Besnard, S., Denise, P., Clarke, A., Blotter, D., 2013. Increased myofiber remodelling and NFATc1-myonuclear translocation in rat postural skeletal muscle after experimental vestibular deafferentation. *J. Vest. Res.* 23, 187–193.
- MacDougall, H.G., Weber, K.P., McGarvie, L.A., Halmagyi, G.M., Curthoys, I.S., 2009. The video head impulse test: diagnostic accuracy in peripheral vestibulopathy. *Neurology* 73, 1134–1141.
- Mancini, M., Horak, F.B., 2010. The relevance of clinical balance assessment tools to differentiate balance deficits. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 46, 239–248.
- Martin, T., Moussay, S., Bulla, I., Bulla, J., Toupet, M., Etard, O., Denise, P., Davenne, D., Coquerel, A., Quarck, G., 2016. Exploration of circadian rhythms in patients with bilateral vestibular loss. *PLoS One* 11, e0155067.
- Meza, G., Solano-Flores, L.P., Poblano, A., 1992. Recovery of vestibular function in young guinea pigs after streptomycin treatment. glutamate decarboxylase activity and nystagmus response assessment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 10, 407–411.
- Moser, V.C., 2011. Functional assays for neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 39, 36–45.
- Nakamagoe, K., Fujizuka, N., Koganezawa, T., Shimizu, K., Takiguchi, S., Horaguchi, T., Ishii, K., Tamaoka, A., 2013. Residual central nervous system damage due to organoarsenic poisoning. *Neurotoxicol. Teratol.* 37, 33–38.
- Nordström, L., Ringberg, H., Cronberg, S., Tjernström, O., Walder, M., 1990. Does administration of an aminoglycoside in a single daily dose affect its efficacy and toxicity? *J. Antimicrob. Chemother.* 25, 159–173.
- Ossenkopp, K.P., Prkacin, A., Hargreaves, E.L., 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.* 36, 875–881.
- Paquet, N., Taillon-Hobson, A., Lajoie, Y., 2014. Fukuda and Babinski-Weil tests: within-subject variability and test-retest reliability in nondisabled adults. *J. Rehabil. Res. Dev.* 51, 1013–1022.
- Pasquet, M.O., Tihy, M., Gourgeon, A., Pompili, M.N., Godsil, B.P., Léna, C., Dugué, G.P., 2016. Wireless inertial measurement of head kinematics in freely-moving rats. *Sci. Rep.* 6, 35689.
- Perez, R., Freeman, S., Sohmer, H., Sichel, J.Y., 2000. Vestibular and cochlear ototoxicity of topical antiseptics assessed by evoked potentials. *Laryngoscope* 110, 1522–1527.
- Perez, R., Nazarian, Y., Sohmer, H., Sichel, J.Y., 2013. The effect of topically applied antimycotic agents on inner ear vestibular and cochlear function. *Laryngoscope* 123, 1033–1039.
- Pollastrini, L., Abramo, A., Cristalli, G., Baretto, F., Greco, A., 1994. [Early signs of occupational ototoxicity caused by inhalation of benzene derivative industrial solvents]. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 14, 503–512 [in Italian].
- Pouyatos, B., Campo, P., Lataye, R., 2002. Use of DPOAEs for assessing hearing loss caused by styrene in the rat. *Hear. Res.* 165, 156–164.
- Quinn, K.J., Rude, S.A., Brettler, S.C., Baker, J.F., 1998. Chronic recording of the vestibulo-ocular reflex in the restrained rat using a permanently implanted scleral search coil. *J. Neurosci. Methods* 80, 201–208.
- Robinson, D.A., 1963. A method of measuring eye movement using a scleral search coil in a magnetic field. *IEEE Trans. Bio-Med. Electron.* 10, 137–145.
- Russell, N.A., Horii, A., Smith, P.F., Darlington, C.L., Bilkey, D.K., 2003. Long-term effects of permanent vestibular lesions on hippocampal spatial firing. *J. Neurosci.* 23, 6490–6498.
- Rybak, L.P., Whitworth, C.A., 2005. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today* 10, 1313–1321.
- Saldaña-Ruiz, S., Hernández-Mir, G., Sedó-Cabezón, L., Cutillas, B., Llorens, J., 2012a. Vestibular toxicity of cis-2-pentenitrile in the rat. *Toxicol. Lett.* 211, 281–288.
- Saldaña-Ruiz, S., Soler-Martín, C., 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.
- Saldaña-Ruiz, 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.* 14, 661–671.
- Schacht, J., Talaska, A.E., Rybak, L.P., 2012. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat. Rec.* 295, 1837–1850.
- Scheenstra, R.J., Rijntjes, E., Tavy, D.L., Kingma, H., Heijerman, H.G., 2009. Vestibulotoxicity as a consequence of systemically administered tobramycin in cystic fibrosis patients. *Acta Otolaryngol.* 129, 4–7.
- Schlecker, C., Praetorius, M., Brough, D.E., Presler, R.G., Jr, Hsu, C., Plinkert, P.K., Staeker, H., 2011. Selective atonal gene delivery improves balance function in a mouse model of vestibular disease. *Gene Ther.* 18, 884–890.
- Selye, H., 1957. Lathyrism. *Rev. Canad. Biol.* 16, 1–82.
- Sedó-Cabezón, L., Jedynak, P., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2015. Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis. Model. Mech.* 8, 1323–1337.
- Sergi, B., Ferraresi, A., Troiani, D., Paludetti, G., Feroni, A.R., 2003. Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. *Hear. Res.* 182, 56–64.
- Serra, A., Salame, K., Liao, K., Leigh, R.J., 2013. Eye movements, vision, and the vestibulo-ocular reflexes. In: Bronstein, A. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 27–33.
- Shepard, N., Janky, K., Eggers, S., 2013. The role of vestibular laboratory testing. In: Bronstein, A.M. (Ed.), *Oxford Textbook of Vertigo and Imbalance*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 145–155.
- Schirmer, M., Kaiser, A., Lessenich, A., Lindemann, S., Fedrowitz, M., Gernert, M., Löscher, W., 2007. Auditory and vestibular defects and behavioral alterations after neonatal administration of streptomycin to lewis rats: similarities and differences to the circling (*ci2/ci2*) Lewis rat mutant. *Brain Res.* 1155, 179–195.
- Schubert, M.C., Herdman, S.J., Tusa, R.J., 2002. Vertical dynamic visual acuity in normal subjects and patients with vestibular hypofunction. *Otol. Neurotol.* 23, 372–377.
- Shoham, S., Chen, Y.C., Devietti, T.L., Teitelbaum, P., 1989. Deafferentation of the vestibular organ: effects on atropine-resistant EEG in rats. *Psychobiology* 17, 307–314.
- Sichel, J.Y., Eliashar, R., Plotnick, M., Sohmer, H., Elidan, J., 2000. Assessment of vestibular ototoxicity of ear drops by recording of vestibular evoked potentials to acceleration impulses. *Am. J. Otol.* 21, 192–195.
- Soler-Martín, C., Díez-Padriza, 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.
- Song, B.B., Anderson, D.J., Schacht, J., 1997. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 369–377.
- Stahl, J.S., Van Alphen, A.M., De Zeeuw, C.I., 2000. A comparison of video and magnetic search coil recordings of mouse eye movements. *J. Neurosci. Methods* 99, 101–110.
- Sultemeier, D.R., Hoffman, L.F., 2017. Partial aminoglycoside lesions in vestibular epithelia reveal broad sensory dysfunction associated with modest hair cell loss and afferent calyx retraction. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 331.
- Takimoto, Y., Imai, T., Kondo, M., Hanada, Y., Uno, A., Ishida, Y., Kamakura, T., Kitahara, T., Inohara, H., Shimada, S., 2016. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibulo-ocular reflex. *Toxicol. Lett.* 262, 49–54.
- Tarnutzer, A.A., Bockisch, C.J., Buffone, E., Weiler, S., Bachmann, L.M., Weber, K.P., 2016. Disease-specific sparing of the anterior semicircular canals in bilateral vestibulopathy. *Clin. Neurophysiol.* 127, 2791–2801.
- Thomas, A., 1940. Afférences labyrinthiques. Équilibre et équilibration. *Masson et Cie, Paris*, pp. 141–564.
- Tjernström, O., 1980. Prospective evaluation of vestibular and auditory function in 76 patients treated with netilmicin. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl. (Suppl. 23)*, 122–125.
- Vignaux, G., Besnard, S., Denise, P., Eleferiou, F., 2015. The vestibular system: A newly identified regulator of bone homeostasis acting through the sympathetic nervous system. *Curr. Osteoporos. Rep.* 13, 198–205.

- Vignaux, G., Chabbert, C., Gaboyard-Niay, S., Travo, C., Machado, M.L., Denise, P., Comoz, F., Hitier, M., Landemore, G., Philoxène, B., Besnard, S., 2012. Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsaniolate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 61–71.
- Wallace, D.G., Hines, D.J., Pellis, S.M., Whishaw, I.Q., 2002. Vestibular information is required for dead reckoning in the rat. *J. Neurosci.* 22, 10009–10017.
- Walther, L.E., 2017. Current diagnostic procedures for diagnosing vertigo and dizziness. *GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.* 16, 1–29.
- Ward, B.K., Agrawal, Y., Hoffman, H.J., Carey, J.P., Della Santina, C.C., 2013. Prevalence and impact of bilateral vestibular hypofunction: results from the 2008 US national health interview survey. *JAMA Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 139, 803–810.
- Wengren, B.I., Anniko, M., 1989. Vestibular hair cell pathology in the dancer mouse mutant. *Acta Otolaryngol.* 107, 182–190.
- Wu, W.J., Sha, S.H., McLaren, J.D., Kawamoto, K., Raphael, Y., Schacht, J., 2001. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear. Res.* 158, 165–178.
- Wu, X., Cai, J., Li, X., Li, H., Li, J., Bai, X., Liu, W., Han, Y., Xu, L., Zhang, D., Wang, H., Fan, Z., 2017. Allicin protects against cisplatin-induced vestibular dysfunction by inhibiting the apoptotic pathway. *Eur J. Pharmacol.* 805, 108–117.
- Xie, J., Talaska, A.E., Schacht, J., 2011. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear. Res.* 281, 28–37.
- Yang, T.H., Liu, S.H., Young, Y.H., 2010a. Evaluation of guinea pig model for ocular and cervical vestibular-evoked myogenic potentials for vestibular function test. *Laryngoscope* 120, 1910–1917.
- Yang, T.H., Liu, S.H., Young, Y.H., 2010b. A novel inner ear monitoring system for evaluating ototoxicity of gentamicin eardrops in guinea pigs. *Laryngoscope* 120, 1220–1226.
- Yorgason, J.G., Fayad, J.N., Kalinec, F., 2006. Understanding drug ototoxicity: molecular insights for prevention and clinical management. *Expert Opin. Drug. Saf.* 5, 383–399.
- Young, Y.H., Chuu, J.J., Liu, S.H., Lin-Shiau, S.Y., 2001. Toxic effects of potassium bromate and thioglycolate on vestibuloocular reflex systems of guinea pigs and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 103–111.
- Zwergal, A., Rettinger, N., Frenzel, C., Dieterich, M., Brandt, T., Strupp, M., 2009. A bucket of static vestibular function. *Neurology* 72, 1689–1692.

Quantitative Assessment of Anti-Gravity Reflexes to Evaluate Vestibular Dysfunction in Rats


**Vanessa Martins-Lopes, Anna Bellmunt, Erin A. Greguske, Alberto F.
Maroto, Pere Boadas-Vaello, Jordi Llorens**

JARO: 553–563 (2019)



Research Article

Quantitative Assessment of Anti-Gravity Reflexes to Evaluate Vestibular Dysfunction in Rats

VANESSA MARTINS-LOPES,¹ ANNA BELLMUNT,¹ ERIN A. GREGUSKE,^{1,2} ALBERTO F. MAROTO,^{1,2}
PERE BOADAS-VAELLO,³ AND JORDI LLORENS^{1,2} 

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

²*Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain*

³*Research Group of Clinical Anatomy, Embryology and Neuroscience (NEOMA), Departament de Ciències Mèdiques, Facultat de Medicina, Universitat de Girona, 17003, Girona, Catalunya, Spain*

Received: 28 March 2019; Accepted: 20 June 2019; Online publication: 11 July 2019

ABSTRACT

The tail-lift reflex and the air-righting reflex are anti-gravity reflexes in rats that depend on vestibular function. To obtain objective and quantitative measures of performance, we recorded these reflexes with slow-motion video in two experiments. In the first experiment, vestibular dysfunction was elicited by acute exposure to 0 (control), 400, 600, or 1000 mg/kg of 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), which causes dose-dependent hair cell degeneration. In the second, rats were exposed to sub-chronic IDPN in the drinking water for 0 (control), 4, or 8 weeks; this causes reversible or irreversible loss of vestibular function depending on exposure time. In the tail-lift test, we obtained the minimum angle defined during the lift and descent maneuver by the nose, the back of the neck, and the base of the tail. In the air-righting test, we obtained the time to right the head. We also obtained vestibular dysfunction ratings (VDRs) using a previously validated behavioral test battery. Each measure, VDR, tail-lift angle, and air-righting time demonstrated dose-dependent loss of vestibular function after acute IDPN and time-dependent loss of vestibular function after sub-chronic IDPN. All mea-

asures showed high correlations between each other, and maximal correlation coefficients were found between VDRs and tail-lift angles. In scanning electron microscopy evaluation of the vestibular sensory epithelia, the utricle and the saccule showed diverse pathological outcomes, suggesting that they have a different role in these reflexes. We conclude that these anti-gravity reflexes provide useful objective and quantitative measures of vestibular function in rats that are open to further development.

Keywords: vestibular assessment, tail-lift reflex test, air-righting reflex test, rat, ototoxicity, 3,3'-iminodipropionitrile

INTRODUCTION

The vestibular system includes a diversity of subsystems to cover the existing variety in its natural stimuli, which include linear and angular accelerations of highly diverse magnitudes (Curthoys et al. 2017). It also drives a variety of responses, from vestibulo-ocular and vestibulo-spinal reflexes to endocrine responses and cognitive inputs (Besnard et al. 2015). Therefore, translational studies require the availability of a multiplicity of methods measuring these diverse functions in animals and humans alike (Llorens et al. 2018). At present, a limited number of methods are available for vestibular assessment in rodents, so only part of the vestibular functions can be measured. In addition, many of these methods present technical and practical difficulties that restrain the dissemina-

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10162-019-00730-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Jordi Llorens · Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL · 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain. Telephone: +34934024277; email: jlllorens@ub.edu

tion of their use or their applicability to certain purposes.

Among the methods historically developed to assess semi-circular canal function in animals, those based on video oculography occupy now a prominent place. These include recording of spontaneous nystagmus (Dyhrfeld-Johnsen et al. 2013), assessment of post-rotatory nystagmus (Chalansonnet et al. 2018), and direct measure of the vestibulo-ocular reflex (Beranek et al. 2012; De Jeu and De Zeeuw 2012; Luebke et al. 2014; Imai et al. 2016). One drawback of these techniques is that they require fixation of the head of the animal. For macular functions, the recording of short-latency vestibular-evoked potentials has been performed in a small number of laboratories (Jones et al. 2011; Sichel et al. 2000). In recent years, the recording of two myogenic potentials evoked by high-frequency vestibular stimulation (VEMPs) in the inferior oblique and the sternocleidomastoid muscles has been demonstrated to assess, respectively, utricular and saccular functions in both humans and laboratory animals (Curthoys et al. 2018). VEMPs are quickly gaining clinical use, but few examples are available of their use in laboratory animals (Vulovic and Curthoys 2011; Yang et al. 2010; Lo et al. 2015; King et al. 2017).

All the main methods to measure vestibular function cited in the previous paragraph require either to firmly restrain or to anesthetize the animal. Also, they do not cover vestibulo-spinal reflex functions. Loss of vestibulo-spinal input causes gross alterations in spontaneous motor activity and motor reflexes that facilitate the identification of animals suffering vestibular dysfunction due to congenital (Jones and Jones 2014) or induced (Llorens et al. 1993) causes. However, few studies include a quantitative assessment of these alterations. In many cases, the presence or absence of some of these abnormalities is observed or rated to simply corroborate that animals are mutant or bear the lesion (Russell et al. 2003; Wallace et al. 2002). In other cases, a non-specific motor test, such as the rotarod test, is used to evaluate vestibular deficiency (Schlecker et al. 2011). Precise recordings of spontaneous motor behavior to robustly assess vestibular function have been reported, but they also require the surgical fixation of a device in the skull of the rat (Pasquet et al. 2016). For more than 25 years, our laboratory has been using a behavioral test battery to obtain a semi-quantitative evaluation of vestibular dysfunction in rats and mice exposed to ototoxic chemicals or other vestibular-damaging conditions (Llorens et al. 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Boadas-Vaello et al. 2005; Soler-Martín et al. 2007; Saldaña-Ruiz et al. 2013; Sedó-Cabezón et al. 2015; Greguske et al. 2019). This test battery has proven to be reliable, robust, and

specific to vestibular dysfunction. It has been successfully used in other laboratories (e.g., Luxa et al. 2013) and modified for the assessment of unilateral lesions (Vignaux et al. 2012; Gaboyard-Niay et al. 2016). However, this method is not fully quantitative and relies on subjective assessment. In the present study, we have studied the suitability for objective and quantitative assessment of two anti-gravity reflexes that are part of this behavioral test battery.

The tail-lift reflex and the air-righting reflex are widely recognized to depend on vestibular function. The tail-lift test (Hunt et al. 1987; Llorens et al. 1993) evaluates the loss of the anti-gravity body and limb extension response. The air-right test (Ossenkopp et al. 1990) evaluates the loss of the anti-gravity righting-in-the-air response. In the present study, we evaluated whether these two reflexes could be used for quantitative assessment by high-speed video recording and subsequent movie analysis. We compared the result of these analyses with that of our previously established semi-quantitative behavioral test battery, using control rats and rats suffering vestibular dysfunction following ototoxic exposure. The data obtained demonstrate the suitability of this non-invasive approach to measure vestibular dysfunction in wake rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Treatments

This study used two lots of male Long-Evans rats ($n=24$ and 27), aged 8–9 weeks, purchased from Janvier Labs (Le-Genest-Saint-Isle, France). The rats were housed in groups of three in standard cages ($215 \times 465 \times 145$ mm) with a bedding of wood shavings. They were acclimatized for 6 days before experimentation, maintained on a 12:12-h light:dark cycle (07: 30–19:30 h) at $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, and had free access to standard diet pellets (TEKLAD 2014, Harlan Laboratories, Sant Feliu de Codines, Spain). On a regular basis, the animals were weighed and evaluated for overall toxicity to limit suffering according to ethical criteria. The use of the animals was in accordance with EU Directive 2010/63 as implemented by Law 5/1995 and Act 214/1997 of the Generalitat de Catalunya, and Law 6/2013 and Act 53/2013 of the Gobierno de España. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona.

The study included two experiments evaluating the effects of acute and sub-chronic exposure to 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN). IDPN is a toxic compound that causes dose-dependent loss of vestibular and auditory hair cells in many different species (Llorens et al. 1993; Crofton et al. 1994; Soler-

Martín et al. 2007). Its use offers maximal flexibility, being effective in many different exposure paradigms, including acute, sub-acute, and chronic patterns of exposure (Llorens et al. 1993; Llorens and Rodríguez-Farré 1997; Seoane et al. 2001b). In the acute exposure experiment, rats were administered 0 (control group), 400 (IDPN 400), 600 (IDPN 600), or 1000 (IDPN 1000) mg/kg of IDPN (>98 %, TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium), i.p., in 2 ml/kg of saline ($n=6$ /group), in accordance with published data (Llorens et al. 1993). The vestibular function of the animals was evaluated before administration and at nine time points up to 13 weeks after exposure. In the sub-chronic exposure experiment, IDPN was administered in the drinking water (Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Sedó-Cabezón et al. 2015). Rats were exposed to tap water only (control group) or to water containing 20 mM IDPN for 4 (IDPN 4 weeks) or 8 (IDPN 8 weeks) weeks ($n=9$ /group). These animals were evaluated for vestibular function before exposure and at weekly or 2-week intervals for 16 weeks after exposure.

At the end of the experimental periods, rats were given an overdose of chloral hydrate (800 mg/kg, i.p.) and decapitated under deep anesthesia for collection of the vestibular sensory epithelia. The temporal bones were immersed in cold fixative for immediate collection of the vestibular sensory epithelia under a fume hood. The first inner ear was dissected in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and the epithelia were processed for scanning electron microscopy (SEM) observation of the hair bundles on their surface. The second inner ear was collected for studies not included in the present work.

Assessment of Vestibular Dysfunction

The loss of vestibular function was assessed by three means. First, a measure was obtained using a semi-quantitative behavioral test battery that has been proven to be sensitive and specific to vestibular function, as reported previously (Llorens et al. 1993; Llorens and Rodríguez-Farré 1997; Boadas-Vaello et al. 2005; Sedó-Cabezón et al. 2015). In this battery, 6 items are rated from 0 (normal behavior) to 4 (highest score of behavioral deficiency) to obtain a total score of 0 to 24 (vestibular dysfunction rating, VDR). Three of these items are alterations in spontaneous behavior (stereotyped circling, retropulsion, and head bobbing) that appear in vestibular-deficient animals. The other three are alterations in reflexes: tail-lift reflex, contact inhibition of the righting reflex, and air-righting reflex. More complete descriptions of this battery have been published previously (Llorens et al. 1993; Boadas-Vaello et al. 2005). The second and third means for assessing the

loss of vestibular function included recording two of the three reflex tests in this battery by high-speed video for slow-motion analysis of the rat's reflexes. In the air-righting reflex test, the rat is held in a supine position at approximately 40 cm of height and released to fall on a foam cushion. In the tail-lift reflex test, the rat is grasped by the base of the tail, gently lifted to approximately 40 cm, and then returned by descending it down to the starting point.

Motor reflexes were recorded using a Casio Exilim ZR700 camera, at 240 frames per second (fps), and 512×384 pixels. The tail-lift reflex was recorded from the rat's profile, while the air-righting reflex was recorded from the front (see Supplementary movies). To facilitate video tracking, the tail-lift reflex was recorded with a red background. Once the acute experiment was completed, an additional measure to ease tracking was included in the protocol and used in the chronic experiment. This consisted of a white marble that was positioned as a marker on the back of the neck of each animal with a small rubber band collar. Video analysis was performed using the free software Kinovea (www.kinovea.org). For the air-righting reflex, the stopwatch element was used to record the time from the release of the animal until it fully righted its head, that is when the animal ended the rotation of its head with the nose pointing down and the auricles pointing up. This occurred with the animal still in the air, or already on the foam. For the tail-lift reflex, each rat was tracked from the nose, neck, and base of the tail throughout the whole movement in a semi-automatic manner. The locations of the points are computed automatically, but can be adjusted at any time if necessary. For further analysis, the data generated by the tracking process were exported to text files.

R programming language was used to analyze the data obtained from the tail-lift reflex. Mathematical calculations of the script for angular changes were performed using the coordinates (Fig. 1) as a function of time obtained from Kinovea. The dot product of the two vectors a and b is defined by:

$$a \cdot b = \|a\| \|b\| \cos \theta$$

where θ is the angle between a and b (radians were converted into degrees). Therefore, the angle between nose, neck, and tail was calculated as:

$$\theta = \cos^{-1} \frac{a \cdot b}{\|a\| \|b\|}$$

where $a \cdot b$ is the dot product of the two given vectors. The nose-neck-tail angle was determined as a function

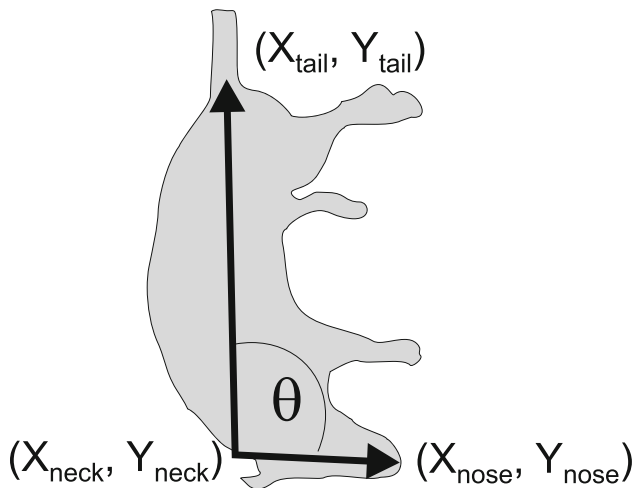


Fig. 1. Geometric interpretation of the angle between the tail-to-neck vector and the neck-to-nose vector. Analysis of the video movies provide the X and Y coordinates of the nose, neck, and tail marks at 1/240 s intervals

of time, and the minimum angle shown by the rat during the tail-lift movement was calculated. Further details of the procedure and the R script are provided as Supplementary text 1.

Scanning Electron Microscopy

After dissection, the vestibular epithelia were fixed overnight at 4 °C. They were then post-fixed for 1 h in 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer, transferred to 70 % alcohol, and stored at 4 °C until further processing. Epithelia were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol up to 100 %, dried in a critical-point dryer using liquid CO₂, coated with carbon, and observed in a JEOL JSM-7001F field emission scanning electron microscope at 15 kV. To assess hair cell loss, the number of hair bundles was obtained in images at ×1500 magnification from the striolar region. Most of the SEM samples from the sub-chronic IDPN experiment were lost due to a failure in the critical-drying process, so only the acute IDPN experiment was available for quantitative analysis.

Statistics

Data are shown as mean ± SE. They were analyzed by repeated measures MANOVA (Wilk's criterion) with day as the within-subject factor. Day-by-day comparisons were performed using the one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc tests. The Pearson coefficient was used to evaluate the correlation of

pairs of data from the same animals. All analyses were done with the IBM SPSS 20 program package.

RESULTS

Effects of IDPN on Body Weight and Overall Health

Acute and sub-chronic exposure of male adult Long-Evans rats to IDPN affected animal body weight, matching the data reported previously (Llorens et al. 1993; Llorens and Rodríguez-Farré 1997; Sedó-Cabezón et al. 2015). Acute exposure to 400 mg/kg IDPN caused no significant effects on body weight, while exposure to 600 or 1000 mg/kg caused a decrease in body weight that progressed for 4–5 days, after which animals resumed body weight gain at a similar rate as control animals. The rats in these two high-dose groups displayed the overt alterations in spontaneous behavior that characterize vestibular-deficient animals (Llorens et al. 1993), but showed no other signs of systemic toxicity; all of them survived the entire experimental period of 91 days. Animals given chronic IDPN by drinking water exposure refrained from increasing in body weight as control animals do. Their body weights restarted with a consistent increase after the end of the exposure. At weeks 11–12, one rat exposed to IDPN for 8 weeks was euthanized according to ethics protocol due to the unexpected appearance of paraparesis, and one rat exposed for 4 weeks was found dead, likely due to fighting with its cage-mates.

Effects of Acute IDPN on Measures of Vestibular Function

Rats exposed to acute IDPN showed a dose-dependent loss of vestibular function as shown by VDR data (Fig. 2A). Thus, IDPN 400 animals showed a very small and transient effect on VDR, while IDPN 600 and IDPN 1000 animals showed high VDRs shortly after exposure and stably until the end of the experiment. Maximal effect was evident in IDPN 1000 rats already by day 3 after the exposure, but only by day 7 in IDPN 600 rats. The MANOVA analysis resulted in significant effects of the day factor ($F(9,12) = 156.2$, $p < 0.001$), treatment factor ($F(3,20) = 729.8$, $p < 0.001$), and day-by-treatment interaction ($F(27, 35.7) = 16.6$, $p < 0.001$). The day-by-day ANOVA analysis resulted in significant differences between treatment groups, at all days from day 3 to day 91 (all $F(3,20) > 97.7$, all $p < 0.001$); detailed results of Duncan's multiple comparison tests are shown in Fig. 2A.

The loss of vestibular function in IDPN 600 and IDPN 1000 rats was also shown by a decrease in the minimum nose-neck-tail angle attained by the animal

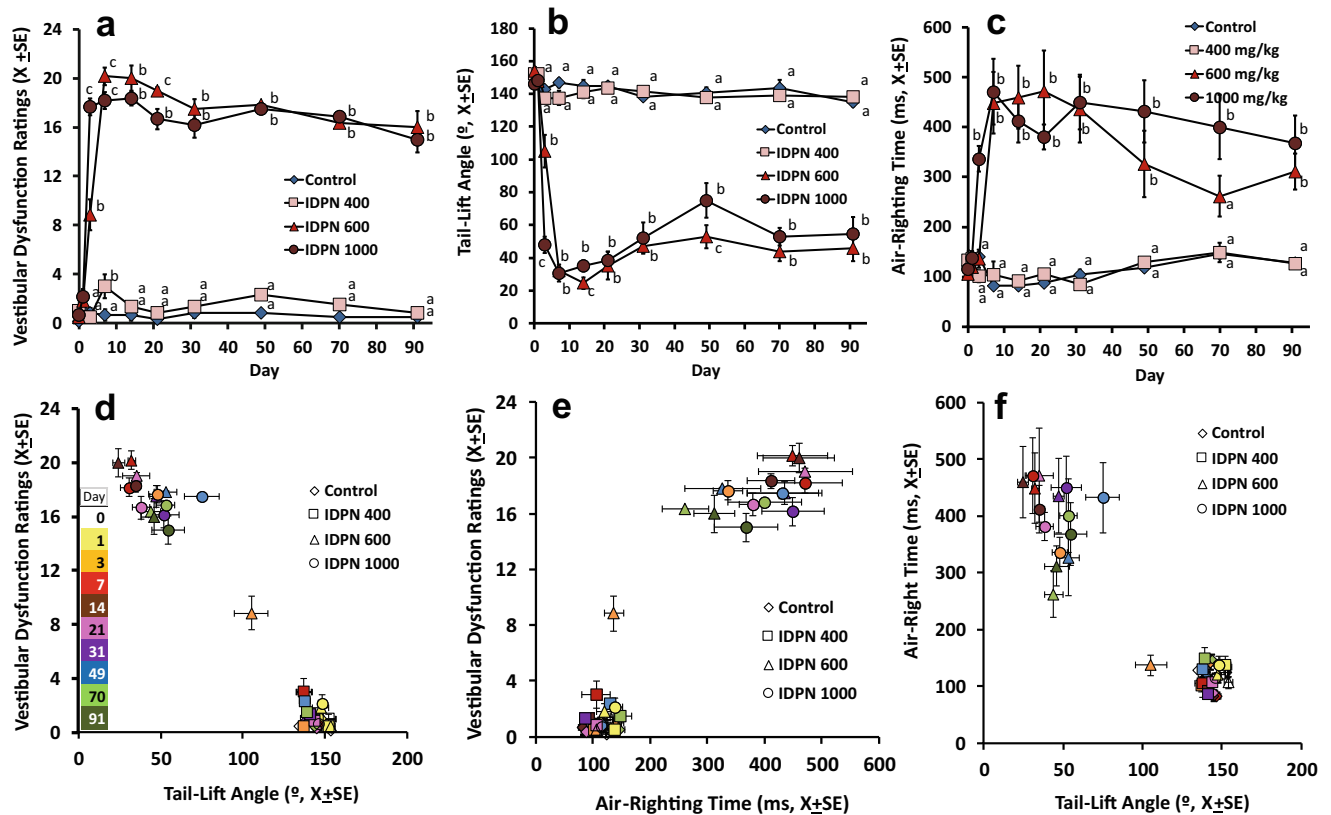


FIG. 2. Effects of acute IDPN on vestibular function. Data are $X \pm SE$ ($n = 6/\text{group}$) of rats treated with IDPN at 0 (control), 400, 600, or 1000 mg/kg. Groups labeled with different letters (a, b, c) are significantly different from each other, $p < 0.05$, Duncan's test after significant ANOVA on that day. **A** Vestibular dysfunction ratings (VDRs). Data are total ratings from a battery of 6 tests sensitive to vestibular dysfunction, each rated 0 (normal behavior) to 4 (extreme evidence of vestibular loss). **B** Tail-lift angle. Data are minimum

nose-neck-base of the tail angles shown by the rats when lifted by the tail and returned. **C** Air-righting time. Data are times elapsed from the moment when the rat is released from a supine position in the air and the moment it rights its head. **D-F** Pair comparisons with VDRs, tail-lift angles, and air-righting times. Each point corresponds to a treatment group (identified by shapes) and time points (identified by colors as shown in panel **D**)

during the tail-lift test (Fig. 2B, Supplementary movies 1–3). Control rats typically showed angles between 130 and 160°, and these tail-lift angles were not modified in the IDPN 400 group. However, minimum angles were largely reduced in IDPN 600 and IDPN 1000 rats, which curled their bodies instead of showing the normal extension response for landing. The reduction in tail-lift angles was persistent and similar in both these high-dose groups. The only relevant difference between these two groups was found in the velocity at which the loss of function appeared: in the IDPN 1000 group, the effect was maximal already by day 3 after injection, while in the IDPN 600 group, this effect had not fully peaked by that time point. The MANOVA analysis resulted in significant effects of the day factor ($F(9,12) = 343.9$, $p < 0.001$), treatment factor ($F(3,20) = 348.3$, $p < 0.001$), and day-by-treatment interaction ($F(27, 35.7) = 15.8$, $p < 0.001$). The day-by-day ANOVA analysis resulted in significant differences between treatment groups, at all days from day 3 to day 91 (all $F(3,20) > 43.8$, all $p < 0.001$); detailed

results of Duncan's multiple comparison tests are shown in Fig. 2B.

Figure 2 also shows the relationship between the three measures of vestibular function depicted as mean and error values for all groups and time points. When all individual and time values ($n = 240$) were used to calculate the Pearson correlation coefficient, a very high coefficient was obtained between the VDR and tail-lift angle (-0.957 , $p < 0.001$). Significant but lower correlation coefficients were obtained between VDR and air-righting time (0.848 , $p < 0.001$) and between tail-lift angle and air-righting time (-0.819 , $p < 0.001$).

Effects of Sub-chronic IDPN on Measures of Vestibular Function

Rats exposed to 20 mM of IDPN suffered a progressive loss of vestibular function during exposure followed by variable degrees of recovery after the end of the exposure. Examples of individual values of the tail-lift

angles of rats receiving sub-chronic IDPN are shown in Fig. 3. These data illustrate the complete recovery of some animals exposed for 4 weeks even after attaining a deep loss of function at the end of the exposure period and the incomplete recovery of the worst case example (Fig. 3A). In animals exposed for 8 weeks (Fig. 3B), good functional recovery was still recorded in some cases, but a complete failure of recovery was recorded in the worst cases.

The loss and recovery in vestibular function were revealed by all measures, including VDR data (Fig. 4A). At group level, the loss of vestibular function was first noticed at 2 weeks of exposure and increased during the next 2 weeks. The animals exposed for 4 weeks showed a significant recovery after the termination of the exposure, and group mean values were not different from the control group means at the end of the survival period. The functional recovery occurred mainly in the first 3 weeks after the end of the exposure. In the group of rats exposed for 8 weeks, the loss of function showed additional progression between 4 and 8 weeks. In contrast to what was observed in the IDPN 4-week group, the termination of the exposure did not trigger significant functional recovery in the IDPN 8-week rats, and the animals showed high VDRs until the end of the experiment after a recovery period of 8 weeks. The MANOVA analysis included weeks 0 to 11, because two animals were lost at week 12 (see above). The analysis resulted in significant effects of the day factor ($F(11,14) = 30.9$, $p < 0.001$), treatment factor ($F(2,24) = 42.7$, $p < 0.001$), and day-by-treatment interaction ($F(22, 28) = 10.6$, $p < 0.001$). The day-by-day ANOVA analysis resulted in significant differences between treatment groups, at all weeks from week 3 to week 16 (all $F(2,24)$ or $F(2,22) > 11.2$, all $p < 0.001$); detailed results of Duncan's multiple comparison tests are shown in Fig. 4A.

The loss of vestibular function in rats exposed to sub-chronic IDPN was also shown by a decrease in the mean minimum nose-neck-tail angle attained by the animal during the tail-lift test (Fig. 4B). Minimum angles were largely reduced by 3 weeks of exposure and further decreased at 4 weeks. After the 4-week time point, a complete recovery occurred in the group of rats in which the exposure was terminated. In contrast, the mean minimum angles remained low in the animals exposed for 8 weeks for the whole exposure period and showed little recovery after the end of the exposure. The MANOVA analysis for weeks 0 to 11 resulted in significant effects of the day factor ($F(11,14) = 20.1$, $p < 0.001$), treatment factor ($F(2,24) = 48.3$, $p < 0.001$), and day-by-treatment interaction ($F(22, 28) = 8.1$, $p < 0.001$). The day-by-day ANOVA analysis resulted in significant differences between treatment groups, at all weeks from week 3 to week 16 (all $F(2,24)$ or $F(2,22) > 10.8$, all $p < 0.001$); detailed results of Duncan's multiple comparison tests are shown in Fig. 4B.

In the air-righting test (Fig. 4C), the IDPN 4-week rats showed an increase in righting times that progressed during exposure and was followed by complete recovery in the mean group values after the end of the exposure. In the rats exposed to 20 mM IDPN for 8 weeks, maximal effects on air-righting times were observed at 4 weeks of exposure. After this time point, a slow decline in times was observed, but this decline was not accelerated after the end of the exposure at 8 weeks, and air-righting times were significantly increased in this group in comparison with the control and IDPN 4-week animals until the end of the experiment. The MANOVA analysis for weeks 0 to 11 resulted in significant effects of the day factor ($F(11,14) = 18.9$, $p < 0.001$), treatment factor ($F(2,24) = 30.1$, $p < 0.001$), and day-by-treatment interaction ($F(22, 28) = 6.9$, $p < 0.001$). The day-by-day ANOVA analysis resulted in significant differences between treatment groups, at all weeks from week 3 to week 16 (all $F(2,24)$ or $F(2,22) > 5.6$, all $p < 0.01$); detailed results of Duncan's multiple comparison tests are shown in Fig. 4C.

Figure 4 also shows the relationship between the three measures of vestibular function in the sub-chronic IDPN experiment, depicted as mean and error values for all groups and time points. Correlation coefficients calculated on all individual and time values ($n = 399$) were -0.937 between VDR and tail-lift angle ($p < 0.001$), 0.764 between VDR and air-righting time ($p < 0.001$), and -0.741 between tail-lift angle and air-righting time ($p < 0.001$).

Effects of Acute IDPN on Surface Morphology of the Vestibular Sensory Epithelia

The SEM analysis of the vestibular epithelia surfaces revealed a dose-dependent loss of hair bundles after acute IDPN (Fig. 5). The progression of the damage showed a crista > utricle > saccule gradient. In the crista (not shown) and the utricle (Fig. 5A–D), loss of hair bundles was evident in the central or peri-striolar regions of some IDPN 400 rats; the loss was almost complete or complete in all IDPN 600 and IDPN 1000 rats. In the saccule (Fig. 5E–H), the extent of the damage in the IDPN 600 rats was less than that in the utricle. Hair bundle counts in the utricle (Fig. 5I) demonstrated significant group differences ($F(3,17) = 48.5$, $p < 0.001$). No significant difference was recorded between control and IDPN 400 rats ($p > 0.05$, Duncan's test), while a significant loss of hair bundles compared with controls was demonstrated in rats exposed to 600 or 1000 mg/kg of IDPN ($p < 0.05$, Duncan's test). In the saccule (Fig. 5L), significant group differences ($F(3,15) = 41.6$, $p < 0.001$) resulted from a 40 % loss of stereocilia bundles in IDPN 600 animals and an almost complete (99 %) loss in IDPN 1000 animals.

Figure 5 also shows the relationship between hair bundle counts in the utricle (Fig. 5J, K) and the saccule (Fig. 5M, N) with the tail-lift angle (Fig. 5J, M)

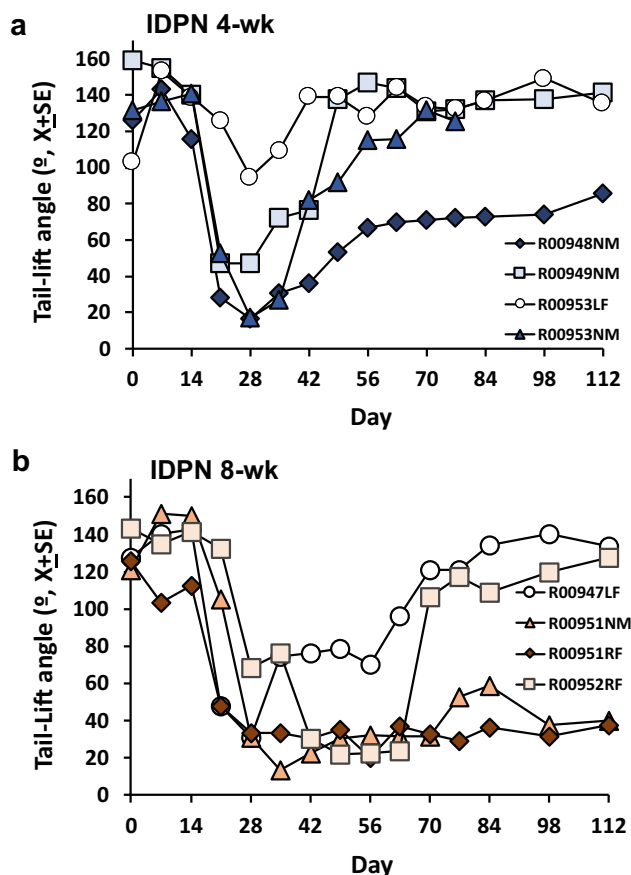


Fig. 3. Effects of sub-chronic IDPN on tail-lift angles. Data are from representative individual animals exposed to 20 mM of IDPN in the drinking water for 4 (A) or 8 (B) weeks

and the air-righting time (Fig. 5K, N). Significant correlations were found between these quantitative measures of vestibular pathology and vestibular function, although these arise mostly from the all or none effects differentiating the control and IDPN 400 groups from the IDPN 600 and IDPN 1000 groups. One exception was the intermediate bundle counts in the saccule of the IDPN 600 animals. The highest correlation coefficient was found for the number of hair bundles in the utricle and the tail-lift angle (0.863, $p < 0.001$, $n = 21$), followed by that of the utricle counts and the air-righting time (-0.754 , $p < 0.001$, $n = 21$). Saccular counts had lower correlation coefficients with the tail-lift angle (0.685, $p = 0.001$, $n = 19$) and the air-righting time (-0.659 , $p = 0.002$, $n = 19$), as IDPN 600 animals showed maximal behavioral effects with only partial loss of hair bundles.

DISCUSSION

The design of new methods to evaluate vestibular function faces several difficulties. One is that the adequate stimuli for vestibular stimulation are angular

and lineal accelerations of the head, which are not easy to perform on experimental animals (Jones et al. 2011; Beraneck et al. 2012; De Jeu and De Zeeuw 2012). Another difficulty is that the endpoints to be measured are usually indirect measures of vestibular function, motor responses that are controlled by vestibular function, but also receive inputs from other systems (Serra et al. 2013; Allum and Carpenter 2013). Although direct recording of vestibular signals can be envisaged, electrical potentials from the vestibular periphery are small, as are the vestibular-evoked potentials (Brown et al. 2017). In addition, cortical areas receiving vestibular input are poorly defined and widely distributed (Brown et al. 2017). In the present study, we have studied the suitability for quantitative assessment of two anti-gravity reflexes for vestibular assessment in rats. These reflexes rely on the constant gravitational acceleration as a stimulus and are therefore based on a completely stable trigger. Also, they consist of highly stereotyped motor responses.

The major role of the vestibular input as a trigger of the air-righting reflex is well known. In the rat, the visual input may modulate the response, but only the labyrinths trigger it, so rats with no vestibular function show no air-righting reflex (Pellis et al. 1989). Diminished or absent trunk and limb extension responses during the tail-lift maneuver have been reported in rats suffering vestibular deficiencies of different origin, including surgical, toxic, and genetic causes (Hunt et al. 1987; Llorens et al. 1993; Llorens and Rodríguez-Farré 1997; Jones and Jones 2014). The vestibular system, through the vestibulo-spinal pathway, exerts a tonic influence on the body and limb extensor muscles (Wilson and Yoshida 1968), as determined by the distribution of the descending projections (Basaldella et al. 2015). The lack of this tonic input due to loss of peripheral vestibular function likely accounts for the decrease in tail-lift angles. While a modulatory role of the visual system has not, to our knowledge, been excluded for the tail-lift reflex, the abnormal response associated with vestibular loss has been stably observed in rats in which unaltered retinal function can be presumed, including mutant and bilabyrinthectomized rats (Llorens et al. 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997).

The performance of the tests and recording of movies suitable for analysis require some practice, but do not pose any major difficulties. For instance, rats may turn the body to one side when lifted by the tail, resulting in a movie offering a ventral or dorsal view of the animal instead of the adequate side view. When this happened, the test was repeated a second or third time, and the best movie was used for the analysis. However, this remains a difficulty possibly reduced by further improvement of the protocol by setting experiment conditions that reduce lateral rolling, improving movie recording through the use of multiple cameras, or adding mathematical modeling to the movie analysis. Using video recording at 240 fps, we

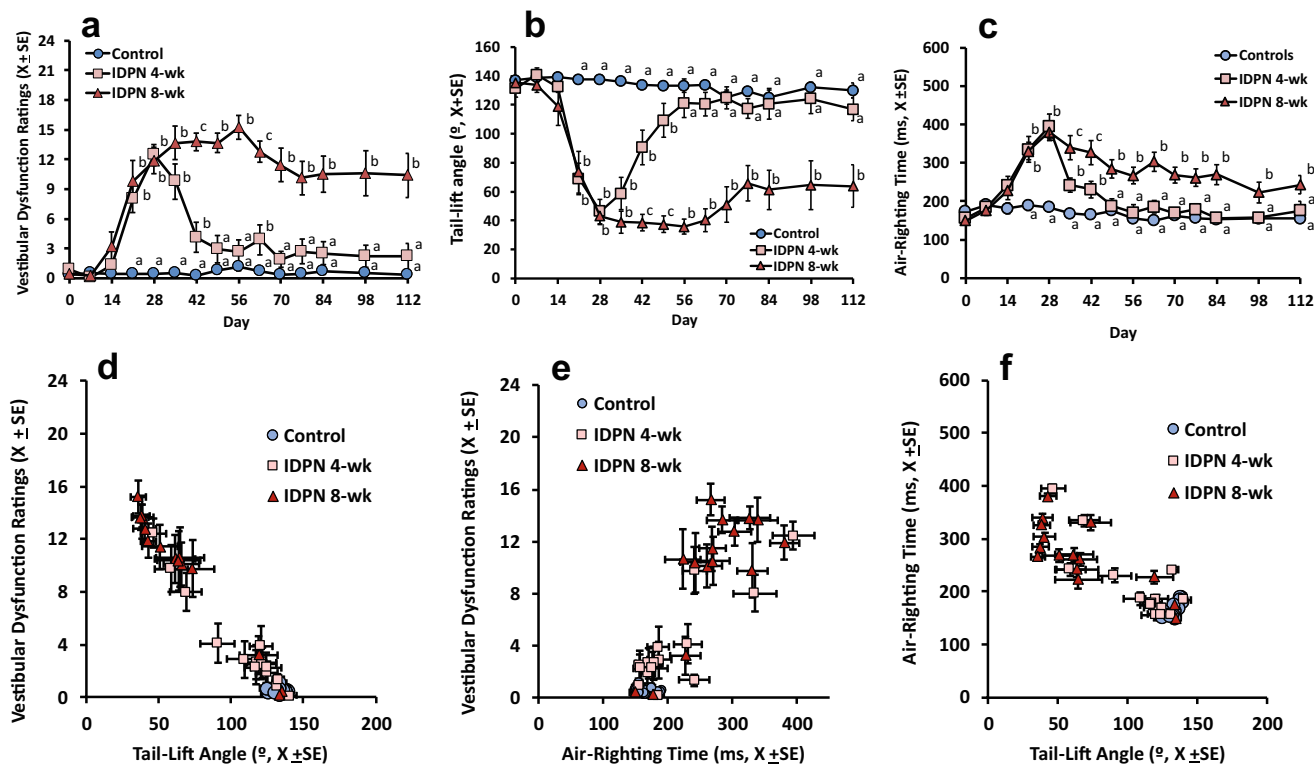


FIG. 4. Effects of sub-chronic IDPN on vestibular function. Data are $X \pm SE$ ($n = 8-9$ /group) of rats treated with 20 mM of IDPN in the drinking water for 0 (control), 4, or 8 weeks. Groups labeled with different letters (a, b, c) are significantly different from each other, $p < 0.05$, Duncan's test after significant ANOVA on that day. **A** Vestibular dysfunction ratings (VDRs). Data are total ratings from a battery of 6 tests sensitive to vestibular dysfunction, each rated 0 (normal behavior) to 4 (extreme evidence of vestibular loss). **B** Tail-

lift angle. Data are minimum nose-neck-base of the tail angles shown by the rats when lifted by the tail and returned. **C** Air-righting time. Data are times elapsed from the moment when the rat is released from a supine position in the air and the moment it rights its head. **D-F** Pair comparisons with VDRs, tail-lift angles, and air-righting times. Each point corresponds to a treatment group (identified by shapes and colors) and time points

obtained movies suitable to calculate the minimum angle in the tail-lift test and the time to right in the air-righting test. This speed of recording is only 8 times the standard speed of video recording (30 fps) and is nowadays available for many domestic photography and video cameras, including smartphones. For the tail-lift test, we explored the utility of alternate measures, such as the mean angle obtained during a certain period around the peak of the reflex and the nose-tail velocity difference, but these resulted in higher within-group variabilities and did not provide any apparent advantage with respect to the minimum angle (data not shown). However, the possibility that these tests may provide additional meaningful measures of vestibular function remains open.

To validate the utility of the tests, we used the acute and sub-chronic IDPN models. Acute IDPN causes a dose-dependent degeneration of hair cells resulting in a rapid loss of vestibular function, which persists throughout the experimental period (Llorens et al. 1993; Llorens and Demêmes 1994; Seoane et al. 2001b; Soler-Martín et al. 2007). In contrast, sub-chronic exposure results in a slowly evolving loss of vestibular function (Llorens and Rodríguez-Farré

1997) that associates with hair cell extrusion (Seoane et al. 2001a; Seoane et al. 2001b), preceded by an initial phase characterized by reversible synaptic uncoupling and hair cell detachment (Sedó-Cabezón et al. 2015; Greguske et al. 2019). Both the tail-lift angle and the air-right time revealed the persistent nature of the deficits caused by acute IDPN and the potential reversibility of the deficits caused by sub-chronic IDPN. Comparison of the high concordance between the VDR graphs and the tail-lift angle graphs, and consideration of the high correlations recorded between these two measures, indicates that the tail-lift angle is a new objective and quantitative measure and likely measures the same functional alteration as the VDR test battery. It is worth noting that the jump of the none-to-high effect observed between the IDPN 400 and the IDPN 600 animals in VDR scores is corroborated by the tail-lift angles. The dose of 400 mg/kg of IDPN was selected to demonstrate an intermediate effect according to previous data (Llorens et al. 1993), but it failed to cause a significant impact on vestibular function in this study. In fact, although hair cell loss was observed in some animals

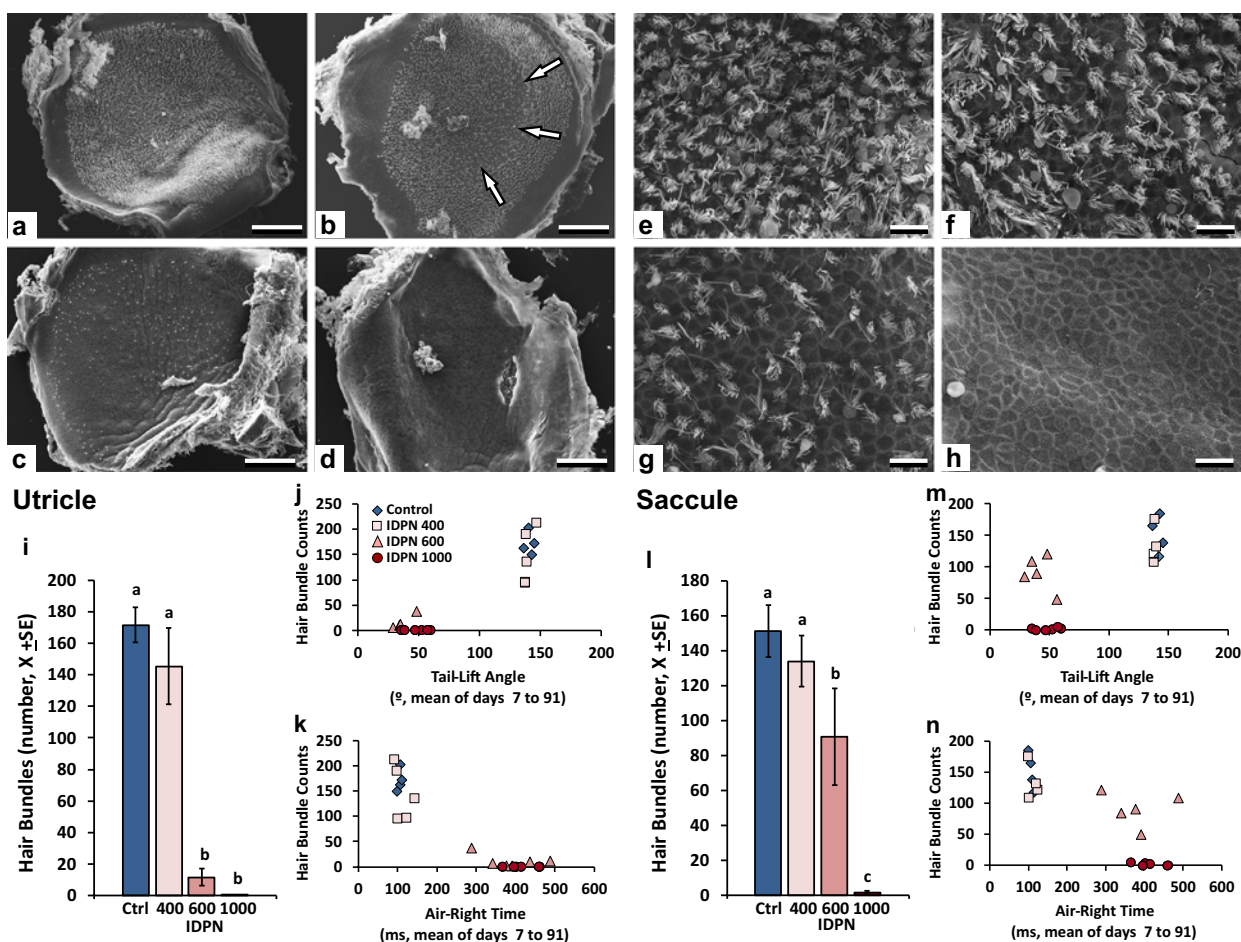


FIG. 5. Effect of acute IDPN on the utricle and the saccule as assessed by SEM analysis of the surfaces of the sensory epithelia. Upper panels show surface images from utricles (A–D) and the central (peri-striolar) region of saccules (E, F) from animals exposed to 0 (control, A and E), 400 (B and F), 600 (C and G), and 1000 (D and H) mg/kg of IDPN. Arrows in B indicate the peri-striolar zone. Scale bars, 100 μ m in A–D; 10 μ m in E–H. (I and L) Number of hair bundles in $\times 1500$ images of the peri-striolar region of utricles and

saccules, respectively. Groups labeled with different letters (a, b, c) are significantly different from each other, $p < 0.05$, Duncan's test after significant ANOVA. (J, K, M, and N) Relationship between hair bundle counts in the utricle (J and K) and saccule (M and N), tail-lift angles (J and M), and air-righting times (K and N). Each point corresponds to the paired data of a single animal, exposed to 0 (control, blue diamonds), 400 (squares), 600 (triangles), or 1000 (circles) mg/kg of IDPN

of this group, others presented intact vestibular epithelia and no statistically significant loss of hair cells was recorded in this group in neither the utricle nor the saccule.

Compared with the VDRs and the tail-lift angles, the air-righting time showed higher variabilities with an apparent higher tendency to recover in the most affected groups, and smaller correlation coefficients with the other two measures. An explanation for these differences would be that the air-righting reflex depends on functional inputs partially different from those on which the tail-lift reflex depends, or it may be more prone to compensation through learning or use of information from other sensory systems. Future investigations may provide answers to these hypotheses.

As a pilot investigation on the cellular basis of these reflexes, we planned the quantification of hair cell

loss using SEM assessment of hair bundle density in the maculae. Samples from the acute experiment allowed for the comparison of the results of the reflex tests with hair cell counts in the utricle and the saccule. For both reflexes, animals fell in one of two groups that were coincidental with dose groups and hair cell counts in the utricle. On one side, control and IDPN 400 animals showed normal or almost normal behaviors and high densities of stereocilia bundles in the utricle. On the other side, IDPN 600 and IDPN 1000 animals showed deeply altered behaviors and complete or almost complete loss of utricular bundles. Saccular counts for IDPN 600 animals did not fit this pattern, because those animals showed deep behavioral dysfunction despite preservation of a significant proportion of stereocilia bundles in the saccule. These data suggest that these reflexes may relate more to utricular than to saccular function.

Although the samples from the chronic experiment were lost, the high correlation found between the air-righting time and particularly the tail-lift angle with the VDR data, together with our published SEM and VDR data on chronic IDPN toxicity (Sedó-Cabezón et al. 2015), supports the conclusion that permanent alteration of these measures results from hair cell loss. The present data are clearly insufficient to make conclusions on the cellular basis of the tail-lift and the air-right reflexes. However, they suggest that the tail-lift angle and the air-righting time may eventually become measurements of specific vestibular functions with well-characterized anatomical substrates.

In conclusion, the present study demonstrates the suitability of high-speed video recording of two anti-gravity reflexes to obtain objective and quantitative measures of vestibular dysfunction in rats. The data obtained demonstrate that the minimum angle drawn by the nose, the neck, and the base of the tail when the rat is lifted by the tail and the time to right the head in the air-right reflex test provide good measures of permanent and transient loss of vestibular function, as elicited by acute or sub-chronic exposure to IDPN. These measures appear to be reliable and easy to implement and appear suitable for further development.

ACKNOWLEDGMENTS

The scanning electron microscopy studies were performed at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). We thank Josep M. Rebled and Eva Parts for technical assistance. We also thank Meritxell Deulofeu, Sílvia Prades and Adrià Ricarte for their contributions to the study as part of their final degree projects.

Funding Information This study was supported by grants BFU2015-66109-R (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO/FEDER, EU) and 2017 SGR 621 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya). E.A.G. was supported by the Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2015 Program) and by the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España (FPU 2015).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The use of the animals was in accordance with EU Directive 2010/63 as implemented by Law 5/1995 and Act 214/1997 of the Generalitat de Catalunya, and Law 6/2013 and Act 53/2013 of the Gobierno de España. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona.

REFERENCES

- ALLUM JHJ, CARPENTER MG (2013) Postural control and the vestibulospinal system. In: In: Bronstein AM (ed) Oxford textbook of vertigo and imbalance. Oxford University Press, Oxford, pp 35–48
- BASALDELLA E, TAKEOKA A, SIGRIST M, ARBER S (2015) Multisensory signaling shapes vestibulo-motor circuit specificity. *Cell* 163:301–312
- BERANECK M, BOJADOS M, LE SÉAC'H A, JAMON M, VIDAL PP (2012) Ontogeny of mouse vestibulo-ocular reflex following genetic or environmental alteration of gravity sensing. *PLoS One* 7:e40414
- BESNARD S, LOPEZ C, BRANDT T, DENISE P, SMITH PF (2015) Editorial: the vestibular system in cognitive and memory processes in mammals. *Front Integr Neurosci* 9:55
- 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
- BROWN DJ, PASTRAS CJ, CURTHOYS IS (2017) Electrophysiological measurements of peripheral vestibular function—a review of electrovestibulography. *Front Syst Neurosci* 11:34
- CHALANSONNET M, CARRERES-PONS M, VENET T, THOMAS A, MERLEN L, SEIDEL C, COSNIER F, NUNGE H, POUYATOS B, LLORENS J, CAMPO P (2018) Combined exposure to carbon disulfide and low-frequency noise reversibly affects vestibular function. *Neurotoxicology* 67:270–278
- 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* 80:129–140
- CURTHOYS IS, GRANT JW, BURGESS AM, PASTRAS CJ, BROWN DJ, MANZARI L (2018) Otolithic receptor mechanisms for vestibular-evoked myogenic potentials: a review. *Front Neurol* 9:366
- CURTHOYS IS, MACDOUGALL HG, VIDAL P-P, DE WAELE C (2017) Sustained and transient vestibular systems: a physiological basis for interpreting vestibular function. *Front Neurol* 8:117
- DE JEU M, DE ZEEUW CI (2012) Video-oculography in mice. *J Vis Exp* 65:e3971
- DYHRFJELD-JOHNSEN J, GABOYARD-NIAY S, BROUSSY A, SALEUR A, BRUGEAUD A, CHABBERT C (2013) Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. *J Vestib Res* 23:177–186
- GABOYARD-NIAY S, TRAVO C, SALEUR A, BROUSSY A, BRUGEAUD A, CHABBERT C (2016) Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: a rat model of vertigo symptoms. *Dis Model Mech* 9:1181–1192
- GREGUSKE EA, CARRERES-PONS M, CUTILLAS B, BOADAS-VAELLO P, LLORENS J (2019) Calyx junction dismantlement and synaptic uncoupling precede hair cell extrusion in the vestibular sensory epithelium during sub-chronic 3,3'-iminodipropionitrile ototoxicity in the mouse. *Arch Toxicol* 93:417–434
- HUNT MA, MILLER SW, NIELSON HC, HORN KM (1987) Intratympanic injections of sodium arsenite (atoxil) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav Neurosci* 101:427–428
- IMAI T, TAKIMOTO Y, TAKEDA N, UNO A, INOHARA H, SHIMADA S (2016) High-speed video-oculography for measuring three-dimensional rotation vectors of eye movements in mice. *PLoS One* 11:e0152307
- JONES SM, JONES TA (2014) Genetics of peripheral vestibular dysfunction: lessons from mutant mouse strains. *J Am Acad Audiol* 25:289–301

- JONES TA, JONES SM, VIJAYAKUMAR S, BRUGEAUD A, BOTHWELL M, CHABBERT C (2011) The adequate stimulus for mammalian linear vestibular evoked potentials (VsEPs). *Hear Res* 280:133–140
- KING EB, SHEPHERD RK, BROWN DJ, FALLON JB (2017) Gentamicin applied to the oval window suppresses vestibular function in Guinea pigs. *J Assoc Res Otolaryngol* 18:291–299
- LLORENS J, CALLEJO A, GREGUSKE EA, MAROTO AF, CUTILLAS B, MARTINS-LOPES V (2018) Physiological assessment of vestibular function and toxicity in humans and animals. *Neurotoxicology* 66:204–212
- 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, 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, RODRÍGUEZ-FARRÉ E (1997) Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 19:117–127
- LO WC, CHANG CM, LIAO LJ, WANG CT, YOUNG YH, CHANG YL, CHENG PW (2015) Assessment of D-methionine protecting cisplatin-induced otolith toxicity by vestibular-evoked myogenic potential tests, ATPase activities and oxidative state in Guinea pigs. *Neurotoxicol Teratol* 51:12–20
- LUEBKE AE, HOLT JC, JORDAN PM, WONG YS, CALDWELL JS, CULLEN KE (2014) Loss of α -calcitonin gene-related peptide (α CGRP) reduces the efficacy of the vestibulo-ocular reflex (VOR). *J Neurosci* 34:10453–10458
- LUXA N, SALANOVA M, SCHIFFEL G, GUTSMANN M, BESNARD S, DENISE P, CLARKE A, BLOTTNER D (2013) Increased myofiber remodelling and NFATc1-myonuclear translocation in rat postural skeletal muscle after experimental vestibular deafferentation. *J Vestib Res* 23:187–193
- 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* 36:875–881
- PASQUET MO, TIHY M, GOURGEON A, POMPILI MN, GODSIL BP, LÉNA C, DUGUÉ GP (2016) Wireless inertial measurement of head kinematics in freely-moving rats. *Sci Rep* 6:35689
- PELLIS SM, PELLIS VC, MORRISSEY TK, TEITELBAUM P (1989) Visual modulation of vestibularly-triggered air-righting in the rat. *Behav Brain Res* 35:23–26
- RUSSELL NA, HORII A, SMITH PF, DARLINGTON CL, BILKEY DK (2003) Long-term effects of permanent vestibular lesions on hippocampal spatial firing. *J Neurosci* 23:6490–6498
- SALDAÑA-RUIZ 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* 14:661–671
- 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
- SEDÓ-CABEZÓN L, JEDYNAK P, BOADAS-VAELLO P, LLORENS J (2015) Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis Model Mech* 8:1323–1337
- SEOANE A, DEMÉMES D, LLORENS J (2001A) 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
- SEOANE A, DEMÉMES D, LLORENS J (2001B) 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
- SERRA A, SALAME K, LIAO K, LEIGH RJ (2013) Eye movements, vision, and the vestibulo-ocular reflexes. In: Bronstein AM (ed) *Oxford textbook of vertigo and imbalance*. Oxford University Press, Oxford, pp 27–33
- 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
- SICHEL JY, ELIASHAR R, PLOTNICK M, SOHMER H, ELIDAN J (2000) Assessment of vestibular ototoxicity of ear drops by recording of vestibular evoked potentials to acceleration impulses. *Am J Otolaryngol* 21:192–195
- VIGNAUX G, CHABBERT C, GABOYARD-NIAY S, TRAVO C, MACHADO ML, DENISE P, COMOZ F, HITIER M, LANDEMORÉ G, PHILOXÈNE B, BESNARD S (2012) Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsenite in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 258:61–71
- VULOVIC V, CURTHOYS IS (2011) Bone conducted vibration activates the vestibulo-ocular reflex in the Guinea pig. *Brain Res Bull* 86:74–81
- WALLACE DG, HINES DJ, PELLIS SM, WHISHAW IQ (2002) Vestibular information is required for dead reckoning in the rat. *J Neurosci* 22:10009–10017
- WILSON VJ, YOSHIDA M (1968) Vestibulospinal and reticulospinal effects on hindlimb, forelimb, and neck alpha motoneurons of the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60:836–840
- YANG TH, LIU SH, YOUNG YH (2010) Evaluation of Guinea pig model for ocular and cervical vestibular-evoked myogenic potentials for vestibular function test. *Laryngoscope* 120:1910–1917

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

Relationship between vestibular hair cell loss and deficits in two anti-gravity reflexes in the rat.

Alberto F. Maroto, Alejandro Barrallo-Gimeno, Jordi Llorens

Hearing Research 410 (2021) 108336



Relationship between vestibular hair cell loss and deficits in two anti-gravity reflexes in the rat.



Alberto F. Maroto^a, Alejandro Barrallo-Gimeno^{a,b}, Jordi Llorens^{a,b,*}

^a Departament de Ciències Fisiològiques, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain

^b Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2021
Revised 5 August 2021
Accepted 11 August 2021
Available online 24 August 2021

Keywords:

Tail-lift reflex test
Air-righting reflex test
Type I hair cells
Type II hair cells
Vestibular epithelia
Rat
Ototoxicity

ABSTRACT

The tail-lift reflex and the air-righting reflex in rats are anti-gravity reflexes that depend on vestibular function. To begin identifying their cellular basis, this study examined the relationship between reflex loss and the graded lesions caused in the vestibular sensory epithelia by varying doses of an ototoxic compound. After ototoxic exposure, we recorded these reflexes using high speed video. The movies were used to obtain objective measures of the reflexes: the minimum angle formed by the nose, the back of the neck and the base of the tail during the tail-lift maneuver and the time to right in the air-righting test. The vestibular sensory epithelia were then collected from the rats and used to estimate the loss of type I (HCI), type II (HCII) and all hair cells (HC) in both central and peripheral parts of the crista, utricle, and saccule. As expected, tail-lift angles decreased, and air-righting times increased, while the numbers of HCs remaining in the epithelia decreased in a dose-dependent manner. The results demonstrated greater sensitivity of HCI compared to HCII to the IDPN ototoxicity, as well as a relative resiliency of the saccule compared to the crista and utricle. Comparing the functional measures with the cell counts, we observed that loss of the tail-lift reflex associates better with HCI than with HCII loss. In contrast, most HCI in the crista and utricle were lost before air-righting times increased. These data suggest that these reflexes depend on the function of non-identical populations of vestibular HCs.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

The vestibular system is the sensory system that encodes head accelerations. As generated by gravity and movements of the body or the head alone, these accelerations can be linear or angular and of a wide diversity of magnitudes. The vestibular system allows for a precise encoding of this large variability of stimuli, thanks to the diversity of functional subsystems that it contains. These are based on the existence of diverse end-organs, types of transducing cells, primary afferent terminals, and physiological properties of the primary neurons (Baird et al., 1988; Desai et al., 2005a, 2005b; Eatock and Songer, 2011; Curthoys et al., 2017; Eatock, 2018).

In mammals, each inner ear has five vestibular sensory epithelia, one crista in each of three semicircular canals, and two maculae in the utricle and saccule (Fig. 1A). In each of these end-organs, the cellular architecture defines two broad areas, that of

the crista central zones and macular striolae, and that of the peripheral zones (Fig. 1B). There are two types of sensory transducing cells, known as hair cells (HCs). The type I HC (HCI) has an amphora-like shape, whereas the type II HC (HCII) is more cylindrical in its upper part (Fig. 1C). HCs are presynaptic to terminals of the afferent neurons of the vestibular ganglion. There are two types of terminals: calyx terminals encase HCI up to their neck, whereas HCII are contacted by standard bouton terminals. These two types of terminals define three types of afferents: calyx-only afferents that exclusively form calyx terminals in the central zones of the epithelia, bouton-only afferents, and dimorphic afferents that form both calyx terminals and bouton terminals. Physiologically, afferents show diverse resting spike timing. Afferents with highly regular timing are more abundant in the peripheral zones of the receptors, while afferents with more irregular spike timing concentrate towards the central crista or the striola of the maculae. On stimulation, more regular or irregular afferents show, respectively, more tonic or transient responses. Thus, irregular afferents are calyx-only or dimorphic and regular afferents are dimorphic or bouton-only, so both HCI and HCII provide input to afferents of

* Corresponding author.

E-mail addresses: amaroto7@ub.edu (A.F. Maroto), abarrallo@ub.edu (A. Barrallo-Gimeno), jllorens@ub.edu (J. Llorens).

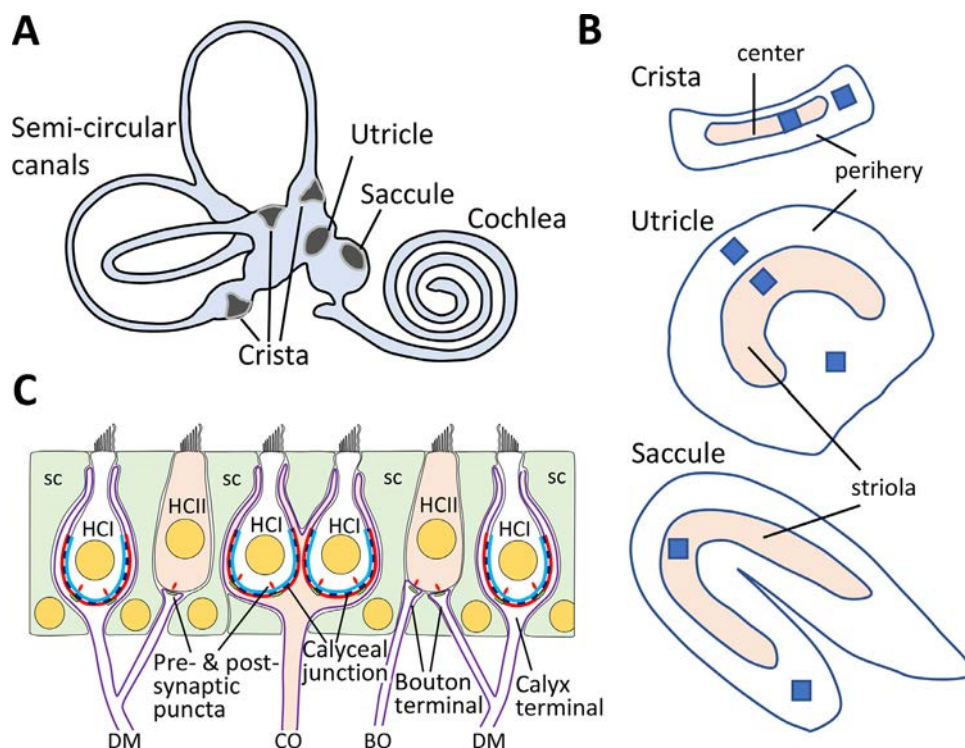


Fig. 1. A. Schematic drawing of the mammalian inner ear, showing the five vestibular sensory epithelia, three cristae, the utricle and the saccule. B. In each vestibular epithelia a central zone (named striola for the utricle and saccule) can be differentiated from the peripheral zones by several histological and physiological criteria. Squares show the approximate size and location of the seven areas imaged for cell counting: crista center, crista periphery, utricle lateral periphery (external to the striola), utricle striola, utricle medial periphery (internal to the striola), saccule striola and saccule periphery. C. Cell types, afferent terminals and structural characteristics of the vestibular epithelium. The epithelium consists of type I hair cells (HCI), type II hair cells (HCII) and supporting cells (sc). Calyceal junctions characterize the contacts between the basolateral part of the HCIs and the facing membrane of the calyces encasing them, as represented by the cyan and red lines, respectively. HCII are contacted by bouton terminals. There are three types of afferents: dimorphic (DM), forming both calyx and bouton terminals, calyx-only (CO) and bouton-only (BO) afferents. Calyx-only afferents characterize the central/striolar regions. The HCs contain pre-synaptic structures (seen as puncta when immuno-labeled) and the afferents contain post-synaptic densities (post-synaptic puncta).

diverse morphological and physiological properties. This arrangement greatly complicates the analysis of the roles played by the diverse zones and HC types in vestibular physiology (Eatock, 2018).

Vestibular information is used for a variety of purposes, including gaze stabilization, motor control and cognitive functions. The understanding of the precise role of each vestibular subsystem to each function is far from being complete. This includes a limited understanding of the substrate underneath vestibular dysfunction symptoms. To tackle these limitations, there is a need for a multiplicity of tests of vestibular function for which the anatomical, cellular, physiological, and molecular substrates are known, including the correspondence between human and animal measures. In clinical settings, testing of vestibular function is increasingly performed through the video head impulse test (vHIT) and assessment of the ocular and cervical vestibular-evoked myogenic potentials (oVEMP and cVEMP, respectively). All of these are measures of reflex responses elicited by fast stimuli. Thus, the vHIT test allows to individually testing the six semicircular canals of the patient at high rotational accelerations that impede interference of the optokinetic reflex (Halmagyi et al., 2017). In the case of VEMPs, available evidence indicates that they reflect mainly the function of afferents from the striolar zone of the utricle (oVEMPs) or the saccule (cVEMPs) (Curthoys et al., 2012; Corneil and Camp, 2018; Curthoys et al., 2017, 2018; Ono et al., 2020).

In comparison to clinical tests, rodent tests of vestibular function remain underdeveloped. The better developed test is the evaluation of the vestibulo-ocular reflex (VOR), with most examples involving mice stimulated with low angular velocities (Beranek et al., 2012; De Jeu and De Zeeuw, 2012; Imai et al.,

2016). Another example is the recording of vestibular evoked potential responses to jerk stimuli in mice, recently shown to be defective in mice with compromised formation of the striolar/central zones (Ono et al., 2020). We have recently described the use of high-speed video recording to obtain objective and fully quantitative measures of two anti-gravitational reflexes in the rat, the tail-lift reflex, and the air righting reflex (Martins-Lopes et al., 2019). The first of these tests evaluates the trunk extension reflex shown by rats when lifted by the tail, by measuring the minimum angle formed by the nose, the back of the neck and the base of the tail during the lift maneuver. This reflex is lost in vestibular deficient animals, which show instead ventral curling, and therefore reduced angles (Hunt et al. 1987; Pellis et al., 1991). The second test evaluates the righting-in-the-air response by measuring the time taken by the head of the rat to right after the animal is released in supine position in the air to fall on a foam cushion. The role of vestibular input in this reflex is well documented (Pellis et al., 1989). Our previous study (Martins-Lopes et al., 2019) demonstrated that the minimum tail-lift angle and the air-righting time provide good measures of vestibular function loss following ototoxic insults. In the present study, we study the relationship between reflex loss and loss of sensory HCs in the vestibular epithelia following the ototoxic insult. To gain insight into the contribution of the different HC types and epithelial zones to the reflexes, we separately estimated the loss of HCI, HCII and all HCs in central/striolar zones and peripheral zones of all three vestibular end-organs. The results suggest that these two reflexes depend on non-identical populations of HCs and that the tail-lift reflex is altered at earlier stages of HC loss than the air-righting reflex.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatments

This study used three lots of male adult (8–9-week-old) Long-Evans rats ($n = 24, 25$ and 24), obtained from Janvier Labs (Le-Genest-Saint-Isle, France). The animals were housed in groups of two or three in standard cages ($215 \times 465 \times 145$ mm) with wood shavings as bedding. Housing conditions were a 12:12 h light:dark cycle (07:30–19:30 h), a temperature of $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, and free access to food pellets (TEKLAD 2014, Harlan Laboratories, Sant Feliu de Codines, Spain). The rats were housed for acclimatization for six days before starting the experiments. During experiments, the animals were regularly weighed and evaluated for overall toxicity to limit suffering according to ethical criteria. The use of the animals was in accordance with EU Directive 2010/63, following Law 5/1995 and Act 214/1997 of the Generalitat de Catalunya, and Law 6/2013 and Act 53/2013 of the Gobierno de España. This included compulsory approval by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona.

HC loss was induced by exposure to 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN), a well characterized ototoxic compound (Crofton and Knight, 1991; Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Crofton et al., 1994; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Soler-Martín et al., 2007; Wilkerson et al., 2018). IDPN (>98%, TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium) was administered i.p. in 2 ml/kg of saline. The first lot of animals was used in an experiment in which rats were administered a single dose of 0 (Control group), 400 (IDPN 400), 600 (IDPN 600), or 1000 (IDPN 1000) mg/kg of IDPN ($n = 6$ / group). Behavioral and scanning electron microscopy data from this experiment have been published elsewhere (Martins-Lopes et al., 2019). For the present study, HC counts were obtained by immuno-fluorescent analysis from the second ear of these animals. In the second experiment, animals received 0, 450 (IDPN 450), 500 (IDPN 500), 550 (IDPN 550), or 600 mg/kg of IDPN ($n = 5$ /group). In the third experiment, rats were administered with 0, 150 (IDPN 3×150), 175 (IDPN 3×175), or 200 (IDPN 3×200) mg/kg•day of IDPN for 3 consecutive days ($n = 6$ /group). Administration of IDPN in three doses over three days has been reported to cause graded ototoxicity with limited systemic toxicity (Crofton and Knight, 1991). The animals were evaluated for vestibular function before exposure and at regular time-points after exposure for 13 weeks (experiment 1) or 4 weeks (experiments 2 and 3). The time-course data from experiment 1 (Martins-Lopes et al., 2019) indicated a stability in the reflex deficits between 4 and 13 weeks. Also, previous histological observations indicate that additional HC loss is unlikely to occur beyond 3 weeks after IDPN administration (Llorens and Demêmes, 1994). The tail-lift reflex was assessed in the three lots of animals and the air-righting reflex was assessed only in experiments 1 and 3.

At the end of the experimental periods, rats were given an overdose of anesthesia and decapitated for the purpose of isolating the vestibular sensory epithelia. The temporal bones were immersed in cold fixative and immediately dissected under a fume hood. The first inner ear of animals in the first experiment was used for scanning electron microscopy as published elsewhere (Martins-Lopes et al., 2019). The other inner ears were collected for the present study.

2.2. Assessment of vestibular reflexes

The tail-lift reflex and the air-righting reflex were assessed using high-speed video recording as described (Martins-Lopes et al., 2019; Maroto et al., 2021). Briefly, in the tail-lift reflex test, the rat is grasped by the base of the tail, gently lifted to approximately 40 cm, and then lowered down to the starting point

(see Supplementary movies A and B for the tail-lift reflex in control and vestibular deficient rats). To facilitate image tracking, a white marble is placed in the back of the neck of the rat with a rubber band collar and the test is done in front of a red background. In the air-righting reflex test, the experimenter holds the rat with the two hands in a supine position at approximately 40 cm of height and suddenly releases it to fall on a foam cushion (see Supplementary movies C and D for the air-righting reflex in control and vestibular deficient rats). The reflex behaviors were recorded at 240 frames per second with a Casio Exilim ZR700 or a GoPro Hero 5 camera. Using the free software Kinovea (www.kinovea.org) for video tracking, we obtained the coordinates of the nose, back of the neck and base of the tail at a 1/240 s frequency during the tail-lift maneuver, and the time from the release of the animal until it fully righted its head in the air-righting reflex test. A script in R programming language was then used to calculate the minimum angle from the nose-neck-tail coordinates during the tail-lift test (Martins-Lopes et al., 2019).

2.3. Immunohistochemistry

The following primary antibodies were used: rabbit anti-Myosin VIIa (Myo7a) from Proteus Biosciences (cat. # 25–6790), rabbit anti-tenascin from Millipore (cat. # AB19013), rabbit anti-oncomodulin from Swant (cat. # OMG4), guinea pig anti-calretinin from Synaptic Systems (cat. # 214–104), mouse anti-Myo7a (clone 138-1-s, IgG1, supernatant) from Developmental Studies Hybridoma Bank, mouse anti-CtBP2/Ribeye (clone 16/CtBP2, IgG1, cat. # 612044) from BD Biosciences, mouse anti-contactin-associated protein (Caspr1) (clone K65/35, IgG1, cat. # 75–001) and anti-PSD95 (clone K28/43, IgG2a, cat# 75–028) from Neuromab. We used the following secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor fluorochromes: 488 goat anti-guinea-pig IgG H+L (catalog #A11073, Invitrogen/Thermo Fisher), 555 donkey anti-rabbit IgGs H+L (#A-31572), 555 goat anti-mouse IgG2a (#A21137), 647 goat anti-mouse IgG1 (#A21240) and 654 donkey anti-mouse IgG H+L (catalog #A-21202). We also used the DyLight 405 donkey anti-rabbit IgG H+L (catalog #711–475–152, Jackson Immuno Research). The nuclear stain 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was obtained from Sigma.

Vestibular epithelia were dissected in cold 4 % freshly depolymerized paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). After dissection, the tissues were fixed for 1 h in the same fixative, transferred to a cryo protective solution (34.5% glycerol, 30% ethylene glycol, 20% PBS, 15.5% distilled water) and stored at -20°C until further processing. For immunolabeling, we followed the protocol by Lysakowski et al. (2011). For most animals, one horizontal crista, one utricle and one saccule were processed. Briefly, samples were placed at room temperature, rinsed, permeabilized with 4% Triton X-100 in PBS (1 h) and blocked with 1% of fish gelatin in PBS containing 0.5% Triton X-100 (1 h). Primary antibodies were incubated in 0.1% Triton X-100 and 1% fish gelatin in PBS for 24 h at 4°C . Samples from all animals were immunolabeled with rabbit anti-Myo7a (1/400), mouse anti-Caspr1 (1/400) and guinea-pig anti-calretinin (1/500). Samples from the second ear of selected animals were also immunolabeled with mouse anti-Myo7a (1/100), rabbit anti-tenascin (1/200), rabbit anti-oncomodulin (1/400), and guinea-pig anti-calretinin (1/500). To assess synaptic puncta, we combined the rabbit anti-Myo7a and the guinea pig anti-calretinin with the mouse IgG1 anti-CtBP2/Ribeye and mouse IgG2a anti-PSD95 antibodies to label one anterior or posterior crista. Available data suggest that all three cristae are similarly affected by IDPN (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Seoane et al., 2001a). Secondary antibodies were incubated in the dark using the same buffer and conditions used with the primary antibodies. Specimens were thoroughly rinsed with PBS after each incubation

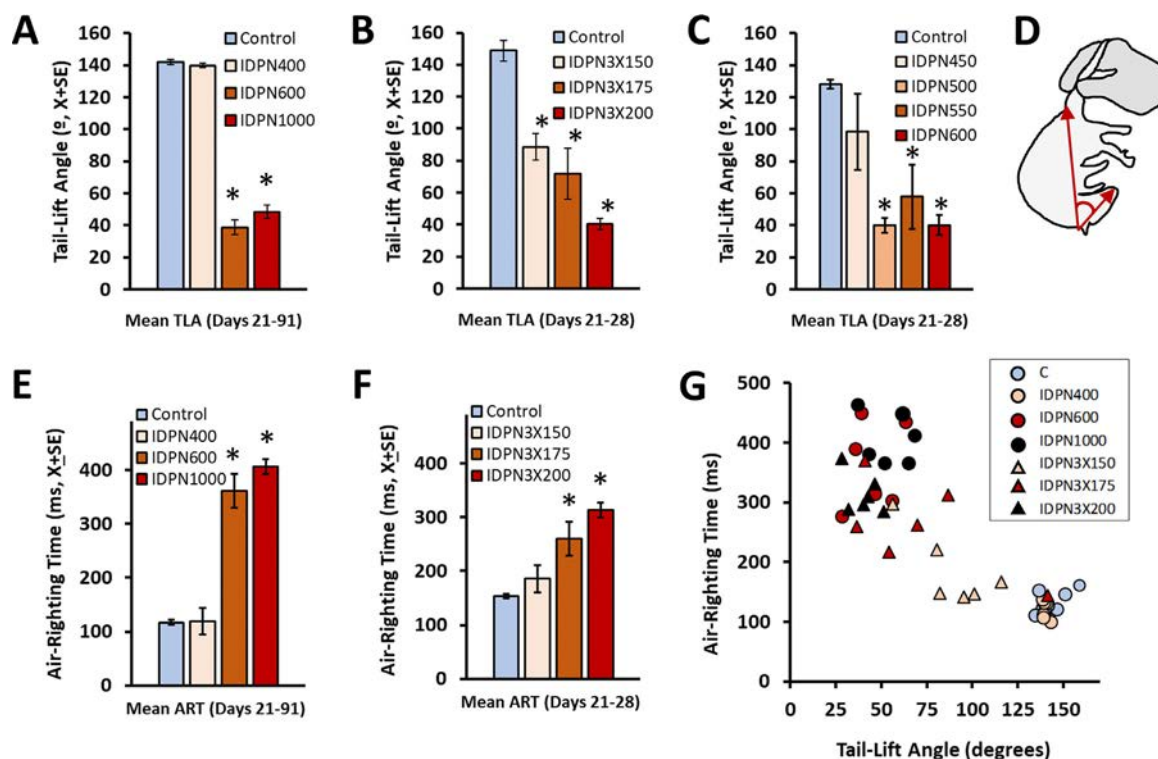


Fig. 2. Effects of the vestibular toxicity of IDPN on the tail-lift and air-righting reflexes. (A-C) Mean \pm SE minimum nose-neck-base of the tail angles displayed by the rats when lifted by the tail and lowered back. (D) Schematic drawing of the tail-lift angle as obtained from a rat suffering a deep loss of vestibular function. (E-F) Mean \pm SE air-righting times displayed by the rats when dropped in supine position from approximately 40 cm above a foam cushion. The data are average values from days 21 to 91 after exposure (A and E, 0–1000 mg/kg, one dose, $n = 6$ /group) or days 21 to 28 after exposure (B and F, 0–200 mg/kg•day, for 3 consecutive days, $n = 6$ /group; and C, 0–600 mg/kg, one dose, $n = 5$ /group). (G) Relationship between individual values of the tail-lift angle and the time to right in the animals whose group values are shown in panels A, B, E and F. *: $p < 0.05$, significantly different from control group, Duncan's test after significant ANOVA.

period. When only three primary antibodies had been used, an incubation of 15 min with DAPI (1/1000) in PBS was intercalated among the final rinses. To assess synaptic contacts, the labelled specimens were included in a bloc of gelatin/albumin as described (Sedó-Cabezón et al., 2015) and sectioned at 40 μ m in a vibrating blade microtome (Leica VT1000S). The whole epithelia or the epithelial sections were finally mounted in Mowiol medium.

2.4. Confocal microscopy, HC counts and synaptic counts

Vestibular epithelia were visualized in a Zeiss LSM880 spectral confocal microscope using a 63 \times (NA: 1.4) objective. Z-stacks of optical sections 0,5 μ m thick (for HC counts) or 0,3 μ m thick (for synaptic counts) were obtained spanning the whole sensory epithelium. HC counts were obtained for images from one central/striolar region and one (crista and saccule) or two (utricle) peripheral regions. The imaged regions were selected by cytoarchitectonic criteria when available (presence of calretinin+ calyces or oncomodulin+ HCs) or by approximate localization (as shown in Fig. 1B) when these had been lost due to the IDPN treatment. In the utricle, separate counts were obtained from the peripheral regions at the external (lateral) and internal (medial) sides to the striola. The obtained thick 3D images were processed with the blend option of the Imaris image processing software (Bitplane), and the resulting filtered images used for cell counts using the Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

The first immunolabeling combination was used to obtain estimates of the numbers of HCs, HCIs and HCII. First, all HCs were identified by the cytoplasmic labeling of the anti-Myo7a antibody (Hasson et al., 1997). Second, the Caspr1 label of the calyceal junctions of the calyces was used to count HCIs (Sousa et al., 2009;

Lysakowski et al., 2011). As argued in the Discussion section below, this label provided a reliable identification of HCIs in the present model, in which HCs either degenerate or survive the toxic insult. Third, we counted cells with overlapping calretinin and Myo7a cytoplasmic label as HCII (Dechesne et al., 1991). The calretinin label of calyx-only afferents in the central areas of the receptors is clearly distinguished from that of HCII (Desmadryl and Dechesne, 1992). Cell counts per stack were obtained manually because we failed to obtain reliable counts using the segmentation functions of the programs used for image processing. Cells transected by the borders of the frame were not counted. As the three counts were obtained using separate images obtained by different combinations of color channels from the same stack, sums of HCI and HCII counts were not identical to all HC counts. In selected animals from the second and third lots, a second combination was used that included the anti-oncomodulin antibody as marker to prominently delineate the central zone of the receptors (Hoffman et al., 2018). With this combination, HCI from peripheral zones of the receptors were identified by the tenascin expression at the calyceal junctions (Lysakowski et al., 2011). In the synaptic study, we counted numbers of pre-synaptic (ribeye) and post-synaptic (PSD-95) puncta on HCII defined by the co-labelling with the anti-Myo7a and anti-calretinin antibodies (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019).

2.5. Statistics

Data are shown as mean \pm SE per dose group. Group comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Duncan's post-hoc tests. To evaluate the relationship between histology counts and behavioral data, two limit values were set to define tail-lift angles and air-righting times corresponding to normal, al-

tered and absent vestibular function, as explained in the Results section. Then, cell counts from the three groups of animals defined by these limit values of angle or time were compared by Kruskal-Wallis ANOVA followed by pairwise Dunn-Bonferroni post-hoc comparisons. Because IDPN1000 animals showed a complete loss of HCs in all epithelia and zones, this group was excluded from these analyses. Student's t-test was used to compare synaptic count data between samples from control and treated animals. All analyses were done with the IBM SPSS 25 program package.

3. Results

3.1. Effects of IDPN ototoxicity on anti-gravity reflexes

Rats exposed to IDPN showed effects on body weight, spontaneous behavior, tail-lift reflex, and air-righting reflex in accordance with previous observations (Crofton and Knight, 1991; Llorens et al., 1993; Martins-Lopes et al., 2019). Body weight loss was transient, and animals returned to weight increase by one week after IDPN administration. The first experiment included rats exposed to 0, 400, 600 and 1000 mg/kg of IDPN and recorded dose- and time-dependent effects on the vestibular reflexes, as previously published (Martins-Lopes et al., 2019). The findings for the tail-lift reflex were confirmed and extended in experiments 2, in which rats received 0, 400, 450, 500, 550 or 600 mg/kg of IDPN, and 3, in which animals were dosed over 3 consecutive days at 0, 3×150 , 3×175 , or 3×200 mg/kg·day (Supplementary Fig. S1). To obtain a single measure of the final effect of the ototoxic treatment on this reflex, we averaged the tail-lift angles from day 21 to the end of the experiment at days 28 (experiments 2 and 3) or 91 (experiment 1), as shown in Fig. 2A-C. The ventral curling of the vestibular-deficient rats results in low angles (Fig. 2D). ANOVA analysis of the averaged tail-lift angles for experiments 1, 2, and 3 resulted, respectively, in $F[3, 20] = 189.3$ ($p = 0.000$), $F[4, 20] = 7.296$ ($p = 0.001$), and $F[3, 17] = 13.44$ ($p = 0.000$).

In agreement with the previous data on the effects of IDPN on the air-righting reflex (experiment 1, Martins-Lopes et al., 2019), a 3-day exposure to IDPN (experiment 3) was found to cause an impairment in performance resulting in dose- and time-dependent increases in air-righting times (Supplementary Fig. 2). Fig. 2E-F show the average air-righting times from day 21 to the end of the experiment for experiments 1 and 3. ANOVA analysis of these averaged times resulted in $F[3, 20] = 76.15$ ($p = 0.000$), and $F[3, 17] = 7.705$ ($p = 0.002$), respectively.

Figure 2G shows the relationship between the tail-lift angles and the air-righting times obtained in individual animals. All control animals had average tail-lift angles above 120 degrees and average air-righting times below 170 ms, so these values were selected as limits to differentiate normal versus abnormal average responses in subsequent analyses. The high IDPN1000 dose group showed average tail-lift angles below 70 degrees and air-righting times above 350 ms. These values defined a second set of limits for responses corresponding to an absence of vestibular input, because the IDPN1000 animals displayed a complete loss of HCs (see below). The dose-dependent effect of IDPN on each of the two reflexes was different and tail-lift angles decreased at doses below those at which air-righting times increased. Thus, four of the six animals in the IDPN 3×150 group had angles in the 70–120 range, below the normal range, while their air-righting times were in the normal range (below 170 ms). Taking all animals into account, only 6 out of 69 rats had tail-lift angles between 70 and 120 degrees, so a majority of the animals in the study could be classified as having either a normal or an absent reflex, and less than 10 % showed a smaller than normal but present response. In the air-righting reflex, we found 14 out of 44 rats with air-righting times between

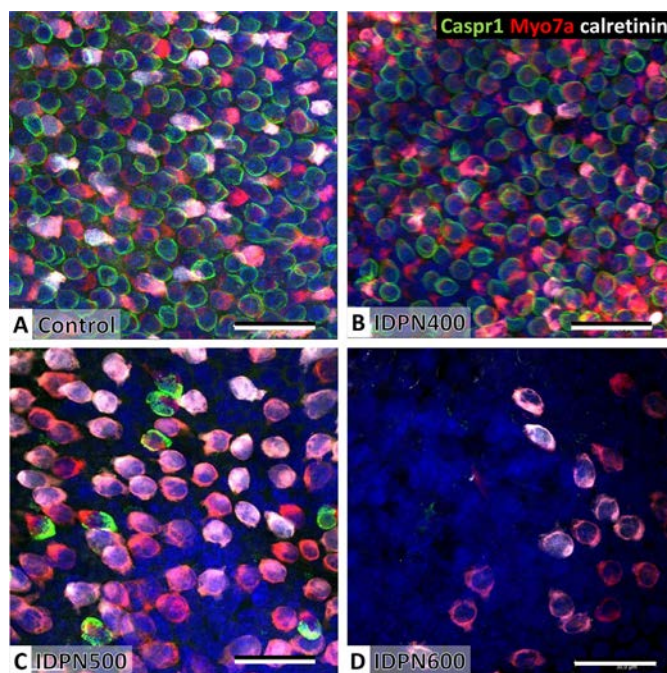


Fig. 3. Effect of ototoxic exposure on the density of sensory hair cells (HCs) in the vestibular epithelia. The example images correspond to the medial part of the utricle, peripheral to the striola. Type I HCs (HCI) are revealed by the Caspr+ label on the inner membrane of the calyx (green). Type II HCs (HCII) show no Caspr+ label but are Myo7a+ (red) and calretinin+ (white). Nuclei were labeled with DAPI (blue). Images shown here are stack projections optimized to provide an overall sense of HC density, not an accurate identification of the cell types. Cells that seem to be Myo7a+, Caspr- and calretinin- may be HCII that express calretinin at low levels or HCI with their calyceal junction in planes not included in the image, and Caspr1+ calyces with no visible Myo7a+ are HCI cells with suboptimal red mark in this particular image. Also, HC superposition may generate apparent calretinin label in Caspr1+ cells. For cell counts, color channels were split as shown in Fig. 4. (A) Normal density of cells in a control rat. (B) Control-like appearance was found in most rats receiving the lowest dose of IDPN (400 mg/kg). (C) Overt loss of HCI and HCII in a utricle of a rat dosed with 500 mg/kg of IDPN. (D) Complete loss of HCI and nearly complete loss of HCII in a rat dosed with 600 mg/kg of IDPN. Scale bars = 30 μ m.

170 and 350 ms, that is, a 30 % of animals with a slower than normal but present reflex.

3.2. Dose-, epithelial zone-, and type-dependent loss of HCs after IDPN exposure

The vestibular sensory epithelia of control rats (Figs. 3–4) showed the expected high density of HCs (Myo7a+), including HCI (identified by the Caspr+ calyx around the basolateral end of the Myo7a+ cytoplasm) and HCII (with cytoplasmic calretinin and Myo7a co-labeling and no calyx). In the macular striola and central crista zones, most of the HCIs were contacted by calyx-only afferent terminals expressing calretinin. The shape of this calretinin label was very different from, and therefore not confused with, the cytoplasmic label of calretinin in HCII, which co-localizes with the Myo7a label.

IDPN caused a dose-dependent loss of HCs as observed in previous studies (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Martins-Lopes et al., 2019). The time course of the HC degeneration induced by acute or sub-acute IDPN has been well characterized, occurs mostly within one week after dosing, is completed by three weeks and does not progress after this time (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Seoane et al., 2001a). Therefore, the data collected represent the final outcome of the toxic lesion. While most of the samples from IDPN400 animals showed a

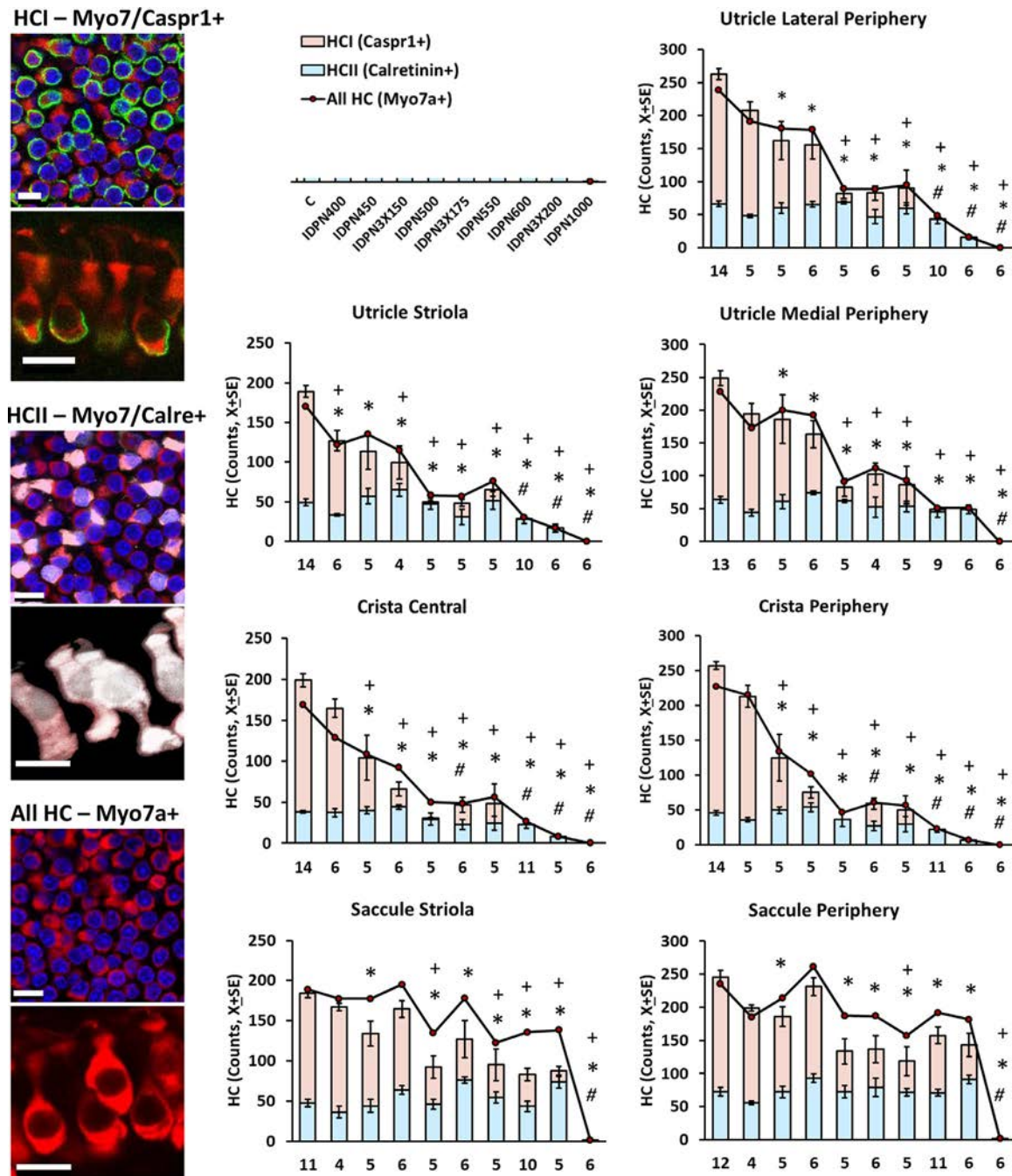


Fig. 4. Differences in the loss of type I hair cells (HCI), type II hair cells (HCII), and all hair cells (HC) after exposure to the ototoxic compound, IDPN, as a function of the dose (400 to 1000 mg/kg, see legend), zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista, and saccule). The images in the left column show the use of the Caspr1 (green) and Myo7a (red) label to identify HCI, use of the Calretinin (white) and Myo7a (red) label to identify HCII and the use of Myo7a (red) label to identify all HCs. Nuclei in blue were labelled with DAPI. Scale bars = 10 μ m. Bar graphs show superposed HCI and HCII counts ($X \pm SE$) according to end-organ, region within it and IDPN dose. The line show mean All HC counts. Error bars for All HCs are not included for clarity. The sum HCI+HCII and All HCs are not identical in all cases because the values correspond to counts obtained from separate images. Numbers below the bars indicate numbers of animals. #, *, +: $p < 0.05$, significantly different from control group for HCII counts, particularly in the saccule.

control-like overall appearance (Fig. 3B), vestibular epithelia from IDPN1000 animals showed no HCs, except for a few sparse HCII remaining in the saccule of 2 of the 6 animals. Therefore, motor responses recorded in the IDPN1000 animals correspond to those independent of vestibular input. Other dose groups showed intermediate degrees of HC loss that varied as a function of HC type, receptor, and zone (Fig. 3C, D). For a quantitative analysis of these differences, counts of HCI (Caspr+), HCII (calretinin+) and all HCs

(Myo7a+) were obtained from all the animals in the three behavioral experiments in seven different fields of observation: striola of the utricle, external extra-striola (lateral periphery) of the utricle, internal extra-striola (medial periphery) of the utricle, central crista, peripheral crista, striola of the saccule, and periphery of the saccule. The histological data of animals from the three behavioral experiments were analyzed as a single experiment as shown in compact format in fig. 4 and type-by-type in Supplementary

Figures S3–S5. Significant effects of IDPN were observed in all 21 ANOVA comparisons (all $F[9, 53-59] > 7.98$, p 's = 0.000), but different dose response relationships were evident in different zones and cell type. For instance, a total loss of HCI was recorded in the central and peripheral crista of IDPN600 animals, while comparison of this group with the Control group in the saccular periphery revealed a 50 % of survival of HCIs and no significant effect on HCII counts (Fig. 4). As another example, the fact that HCII counts in the saccular periphery were only reduced after the highest dose (1000 mg/kg) of IDPN clearly differed from the significant 33% decrease in HCI recorded already at the lowest one (400 mg/kg) in the striola of the utricle (Fig. 4). Fig. 4 also shows that we recorded counts of all HCs somewhat lower than the sum of HCI and HCII counts in the crista and utricles of Control rats and in the crista center and utricle peripheries of IDPN400 rats. In contrast, counts of all HCs higher than HCI+HCII counts were recorded in the saccular striola and periphery of several treatment groups, as well as in the crista of IDPN3 × 150 rats.

The numbers of HCs of each type and in each epithelial zone were estimated using a second antibody combination with samples from the second ear of the rats in the second and third experiment. In this combination, oncomodulin delineates the central/striola zone of the receptors. The data gathered (see supplementary material Fig. S6–S8), provided a confirmatory replicate of the different dose-response relationships that characterize different zones and cell types.

3.3. Relationship between HC loss and deficits in anti-gravity reflexes

As a first approximation to identify the cellular basis of the tail-lift reflex and the air-righting reflex, we plotted the HC counts by type of cell, epithelium and zone against the quantitative measures of the reflexes. As shown in Figs. 5–10, the expected overall basic pattern was recorded: different doses of the ototoxic compound caused varying degrees of HC loss and in parallel decreases in tail-lift angles and increases in air-righting times were recorded. However, the relationship between the cell count and behavioral effect varied as a function of the cell type, end-organ and epithelial zone considered. The IDPN1000 rats were excluded for statistical analyses of these relationships because they showed no HC remaining in any of the vestibular epithelia.

As shown in Fig. 5, low tail-lift angles associated with low numbers of HCI counts in all epithelia and zones. In all cases, statistically significant differences were found among HCI numbers from animals showing high (above 120 degrees, normal), medium (between 120 and 70 degrees, reduced vestibular function) or low (below this limit value, absent function) angles. In pair-wise comparisons, significant differences were found between animals with high and low angles in all epithelia and zones. HCI counts in the crista center and periphery were significantly lower in the medium than in the high angle animals, whereas significant differences were recorded between the medium and low angle animals in the utricle medial periphery and the saccule periphery. In contrast, a significant decrease in HCII counts (Fig. 6) was recorded in all crista and utricle zones to occur between medium and low angle animals, not between high and medium angle animals. In the saccule, an apparent increase in HCII occurred in medium angle compared to high angle animals, but no difference was found between high and low angle animals. With the exception of the IDPN1000 animals, which had been excluded from the statistical analyses, many treated animals showed a complete loss of the tail-lift extension reflex while still retaining a control-like density of HCII in the saccule. When all (Myo7a+) HCs were considered, significant differences were recorded in all epithelia and zones between animals with angles above the 120 limit and those with angles below the 70 degrees limit. No significant differences were recorded between

medium and high angle animals, while significant differences occurred in the utricle and saccule regions between medium and low angle animals.

The relationship between air-righting times and HCI counts are shown in Fig. 8. For all epithelia and zones, the groups of animals with times greater than the 170 and 350 ms limit values had significantly lower numbers of HCIs than the rats showing times within the normal range. However, the group of animals with air-righting times within the normal range included animals with frankly reduced numbers of HCI in the crista and utricle. For HCII (Fig. 9), statistically significant differences were found between low and medium and between low and high times in the crista center, crista periphery, utricle striola and utricle lateral periphery, but not for utricle medial periphery or saccular striola and periphery. Significant count differences were found for all (Myo7a+) HCs (Fig. 10) between low and medium and between low and high times in all epithelia and zones except for the saccular periphery.

The relationships between the behavioral and histological data were also examined using the second series of immunohistochemical labels. These labels offered a more precise localization of the striola/center regions of the epithelia, but a smaller number of samples were available for analysis. As shown in Supplementary Fig. S9 to S14, the results obtained with this second combination of antibodies were similar to those obtained with the first combination.

3.4. Synaptic puncta numbers in surviving HCII

The comparisons of cell numbers shown above clearly indicated that HCI are more sensitive to IDPN toxicity than HCII. However, surviving cells may have partially or totally lost function (Hirvonen et al., 2005). Recent research has shown that synaptic uncoupling is one of the causes of functional loss before HC loss becomes evident (Sedó-Cabezón et al., 2015; Sultemeier and Hoffmann, 2017; Cassel et al., 2019; Greguske et al., 2019). To evaluate the possibility that surviving HCII were suffering synaptic uncoupling, we assessed pre- and post-synaptic puncta numbers in cristae of animals selected to be representative of the different degrees of behavioral dysfunction. The results obtained (Fig. 11) did not support that surviving HCII were suffering synaptic uncoupling. Thus, the number of pre-synaptic Ribeye puncta and of the post-synaptic PSD95 puncta were similar in HCII of control and IDPN-treated animals. Student's test t values were 0.138 for ribeye puncta and 0.403 for PSD95 puncta, both $p > 0.05$ (20 d.o.f.). Also, no significant differences were found for numbers of ribeye or PSD95 puncta per HCII cell among groups of rats with high, medium, or low tail-lift angles, or among rats with low, medium, or high air-righting times.

4. Discussion

The vestibular system is stimulated by accelerations that largely vary in frequency and intensity. These diverse stimuli are encoded to be used in a large variety of reflex behaviors and motor control functions, as well as cognitive functions. The identification of the cellular basis of each vestibular function will contribute to our understanding of the biological roles of this system and contribute to our ability to confront vestibular deficits and diseases. In the present work, we have used a clinically relevant approach, exposure to an ototoxic compound, to cause diverse degrees of damage in the vestibular sensory epithelia, and to evaluate the relationship between the degree of damage and the functional loss in two vestibular reflexes in the rat. The results further support our conclusion that the tail-lift reflex and the air-righting reflex provide

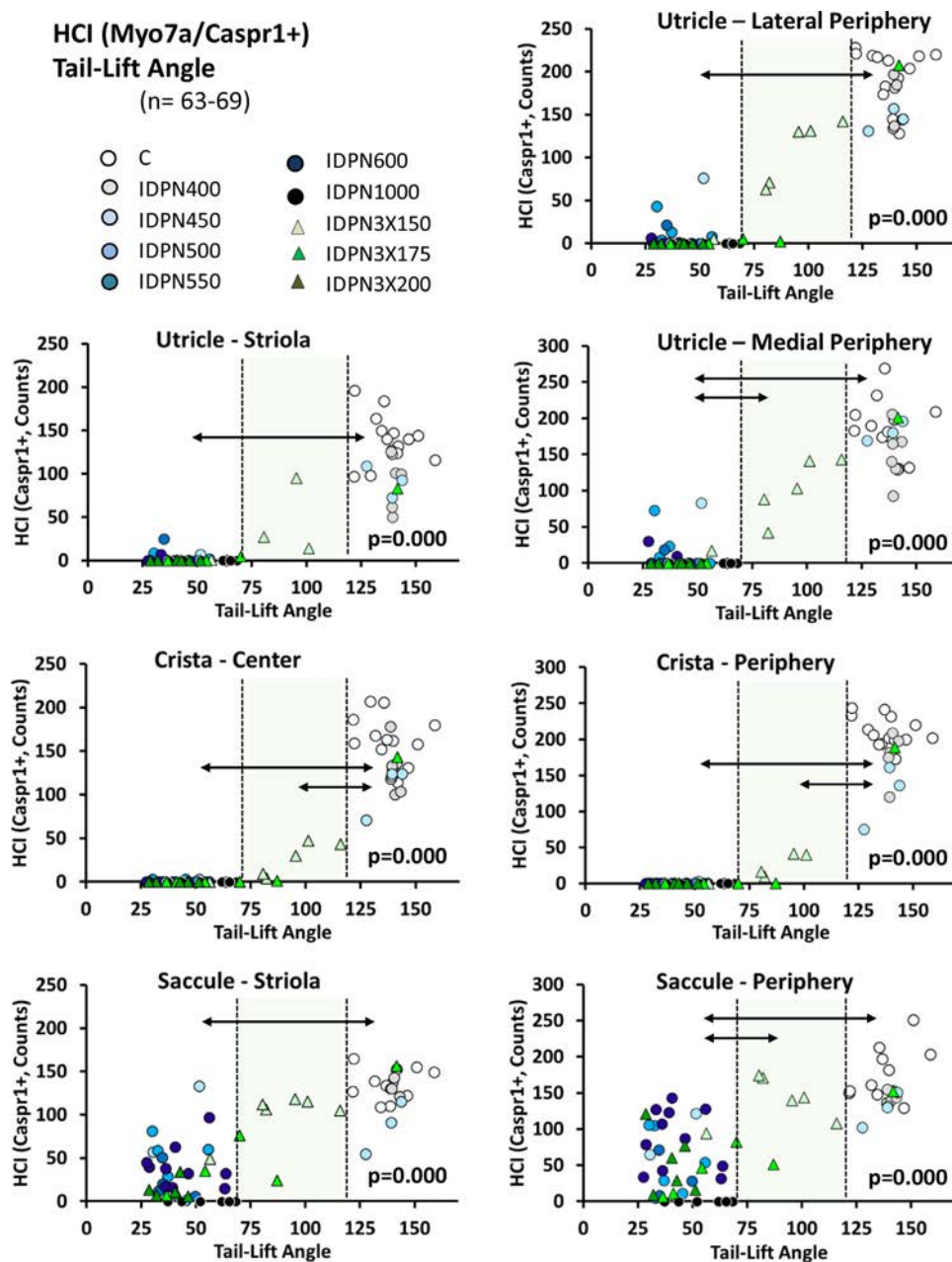


Fig. 5. Relationship between HCl loss and tail-lift angle decrease after exposure to a variety of doses of the ototoxic compound, IDPN, as a function of the zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista and saccule). Individual data shown here correspond to those shown as group means in Fig. 2A-C (angles) and Fig. 4 (HCl counts). On each panel, the vertical dashed lines indicate the limit of normal angles (120 degrees, defined by the Control group) and angles in complete absence of vestibular function (70 degrees, defined by the IDPN1000 group). These limit values classified rats into three groups with high, medium and low angles. The p value in each panel indicates statistical significance in HCl counts among these three groups of rats, after exclusion of the IDPN1000 animals. Double-headed arrows denote significance ($p < 0.05$) of the post-hoc pair-wise comparisons.

a useful quantitative measure of vestibular dysfunction (Martins-Lopes et al., 2019). Although the ototoxic treatment caused body weight loss, this side effect was transient and unlikely to affect the reflex measures.

HC counts were obtained from epithelia immunolabeled with antibodies against Caspr1 to mark HCl, calretinin to mark HCII, and Myo7a to mark all HCs. Myo7a is a well-known and widely used HC marker (Pujol et al., 2014). Caspr1 is not a marker of HCIs but can be used for this purpose because it labels the post-synaptic membrane in the inner side of the calyces (Sousa et al., 2009; Lysakowski et al., 2011; Sedó-Cabezón et al., 2015). In previous studies, we have shown that this protein can be reversibly down-regulated during chronic IDPN toxicity, an exposure model

in which HC detachment from the afferent terminals and synaptic uncoupling precedes HC degeneration (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). However, acute or sub-acute IDPN exposure causes irreversible HC degeneration (Llorens et al., 1994; Seoane et al., 2001a,b) and the stability of the behavioral effect recorded here matches this HC loss, not a reversible loss of Caspr1. Other ototoxicity models have been reported to cause persistent calyx damage despite enduring presence of the corresponding HCl (Hirvonen et al., 2005; Sultemeier and Hoffman, 2017). In the present study, any HCl remaining in the epithelium after loss of its Caspr1+ calyx would have been counted as HCs (Myo7a+), but neither as HCl, nor as HCII. We hypothesize that these were not providing physiologically useful signals to the vestibular pathway,

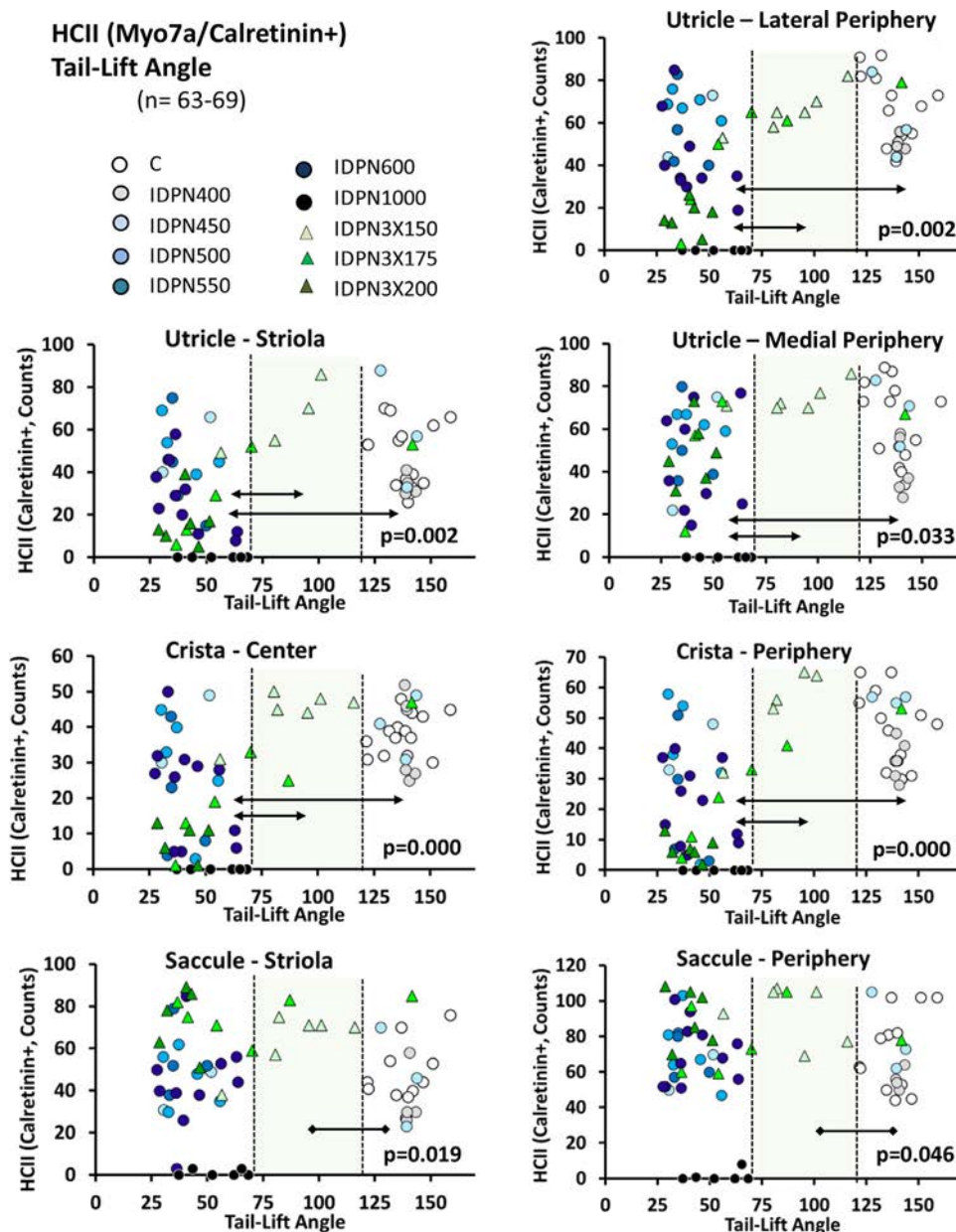


Fig. 6. Relationship between HCII loss and tail-lift angle decrease after exposure to a variety of doses of the ototoxic compound, IDPN, as a function of the zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista and saccule). Individual data shown here correspond to those shown as group means in Fig. 2A-C (angles) and Fig. 4 (HCII counts). On each panel, the vertical dashed lines indicate the limits of normal angles (120 degrees, defined by the Control group) and angles in complete absence of vestibular function (70 degrees, defined by the IDPN1000 group). These limit values classified rats into three groups with high, medium and low angles. The p value in each panel indicates statistical significance in HCII counts among these three groups of rats, after exclusion of the IDPN1000 animals. Double-headed arrows denote significance ($p < 0.05$) of the post-hoc pair-wise comparisons. In the saccule periphery and striola, HCII counts in medium angle animals were higher than in high angle animals.

as illustrated by the chronic toxicity model (Sedó-Cabezón et al., 2015; Greguske et al., 2019). HCII counts were obtained using the calcium binding protein, calretinin, as marker. In the rat, the expression of calretinin has been reported to occur in 5–10 % of HCI, and from 20 % in cristae to 80 % in peripheral utricle of HCII (Desai et al., 2005a, b). In our specimens, we observed that levels of calretinin may vary largely, and this may have caused loss of some of these cells during segmentation of the images, causing a reduction in the estimated number of HCII. This may account at least in part, for the larger HCI/HCII ratios found in the present study in comparison to previous (Desai et al., 2005 a,b) studies. Regarding the smaller number of all HCs compared to HCI+HCII in some crista and utricle counts from Control and IDPN400 animals,

a likely explanation is the underestimation of Myo7a+ cells due to the difficulties in discerning cells in very densely packed epithelia from untreated epithelia.

Because of the known difficulty in causing vestibular HC loss in rats with the most clinically relevant ototoxins, the aminoglycoside antibiotics (Granados and Meza, 2005), we used an experimental ototoxin whose effects show many similarities with those of the aminoglycosides. These include the progression of the damage in epithelium- and zone-dependent manners. Starting with the pioneering work by Lindeman (1969), the literature contains many references, including ours on IDPN (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994), stating that HCI are more sensitive to ototoxic-induced degeneration than HCII, and that the sus-

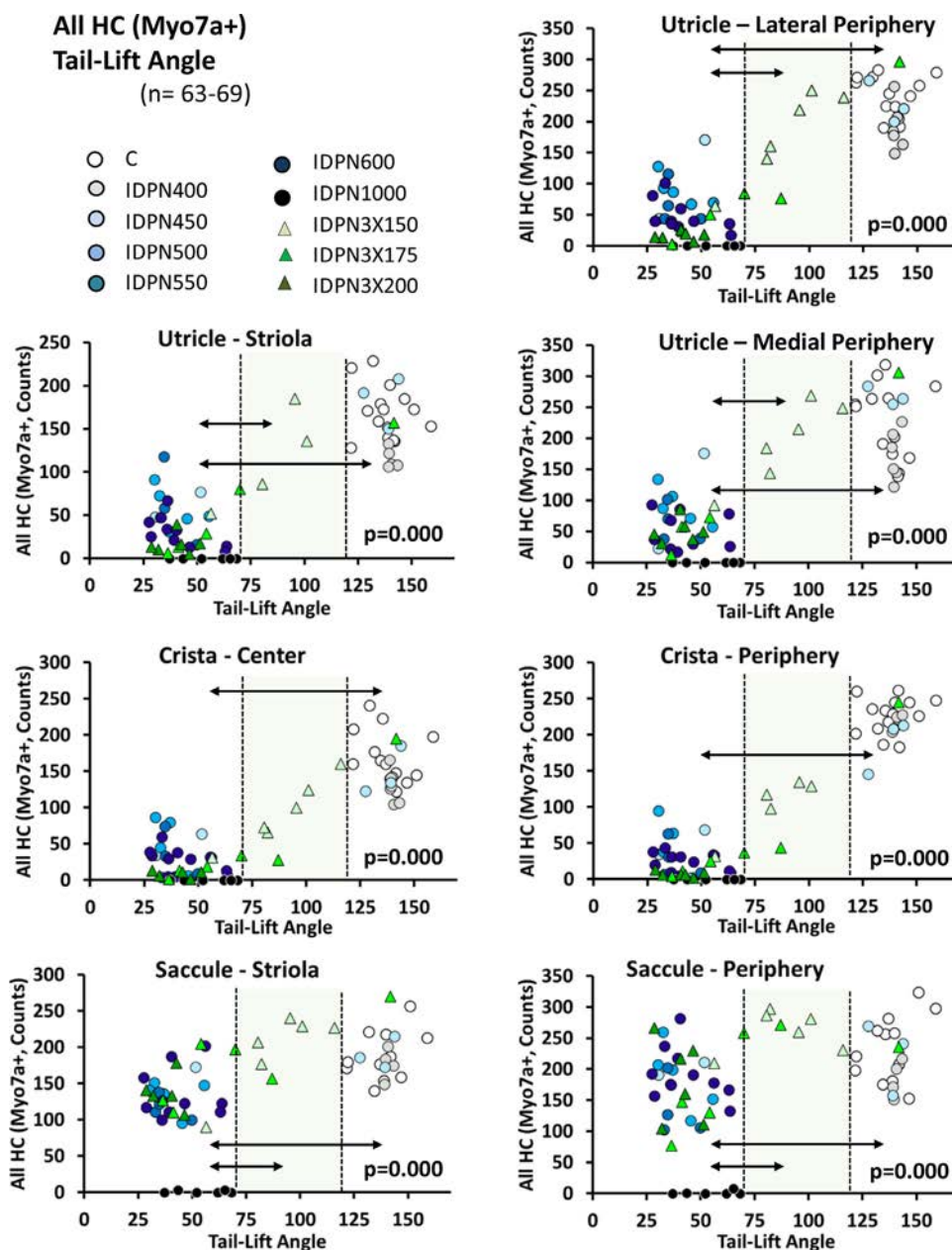


Fig. 7. Relationship between all HC loss and tail-lift angle decrease after exposure to a variety of doses of the ototoxic compound, IDPN, as a function of the zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista and saccule). Individual data shown here correspond to those shown as group means in Fig. 2A-C (angles) and Fig. 4 (all HC counts). On each panel, the vertical dashed lines indicate the limits of normal angles (120 degrees, defined by the Control group) and angles in complete absence of vestibular function (70 degrees, defined by the IDPN1000 group). These limit values classified rats into three groups with high, medium and low angles. The p value in each panel indicates statistical significance among these three groups of rats, after exclusion of the IDPN1000 animals. Double-headed arrows denote significance ($p < 0.05$) of the post-hoc pair-wise comparisons.

ceptibility progresses in a crista > utricle > saccule order and from the central zones to the periphery of the receptors. However, surprisingly few studies have provided quantitative assessment of these differences (Lopez et al., 1997; Nakayama et al., 1996; Hirvonen et al., 2005). In the present study, the data clearly demonstrated the higher susceptibility of HCl compared to HClI to IDPN ototoxicity, and the relative resistance of the saccule to this effect. In contrast, we found no clear differences in susceptibility to the ototoxic damage between the crista and the utricle or between the central and peripheral regions. In any case, the greater resistance of HClI and the saccule to ototoxic damage observed here likely relates to the differential susceptibility known to occur in the auditory system. Thus, in the cochlea, inner HCs are

more resistant than outer HCs to aminoglycoside and cisplatin toxicity, and the susceptibility decreases progressively from the basal to the apical ends, resulting in the characteristic clinical deficits in frequency discrimination and high frequency hearing. The precise basis of these differences is not established but is believed to result from intrinsic biochemical and physiological differences among HCs (Lee et al., 2013; Fettiplace and Nam, 2019).

Increasing the doses of the toxic compound administered to the animal expectedly resulted in more extensive damage and deeper functional loss. The data allowed choosing limit values for normal responses, as defined by the behavior of control rats. In addition, comparison of histological and behavioral data allowed defining the responses corresponding to absence of vestibular input,

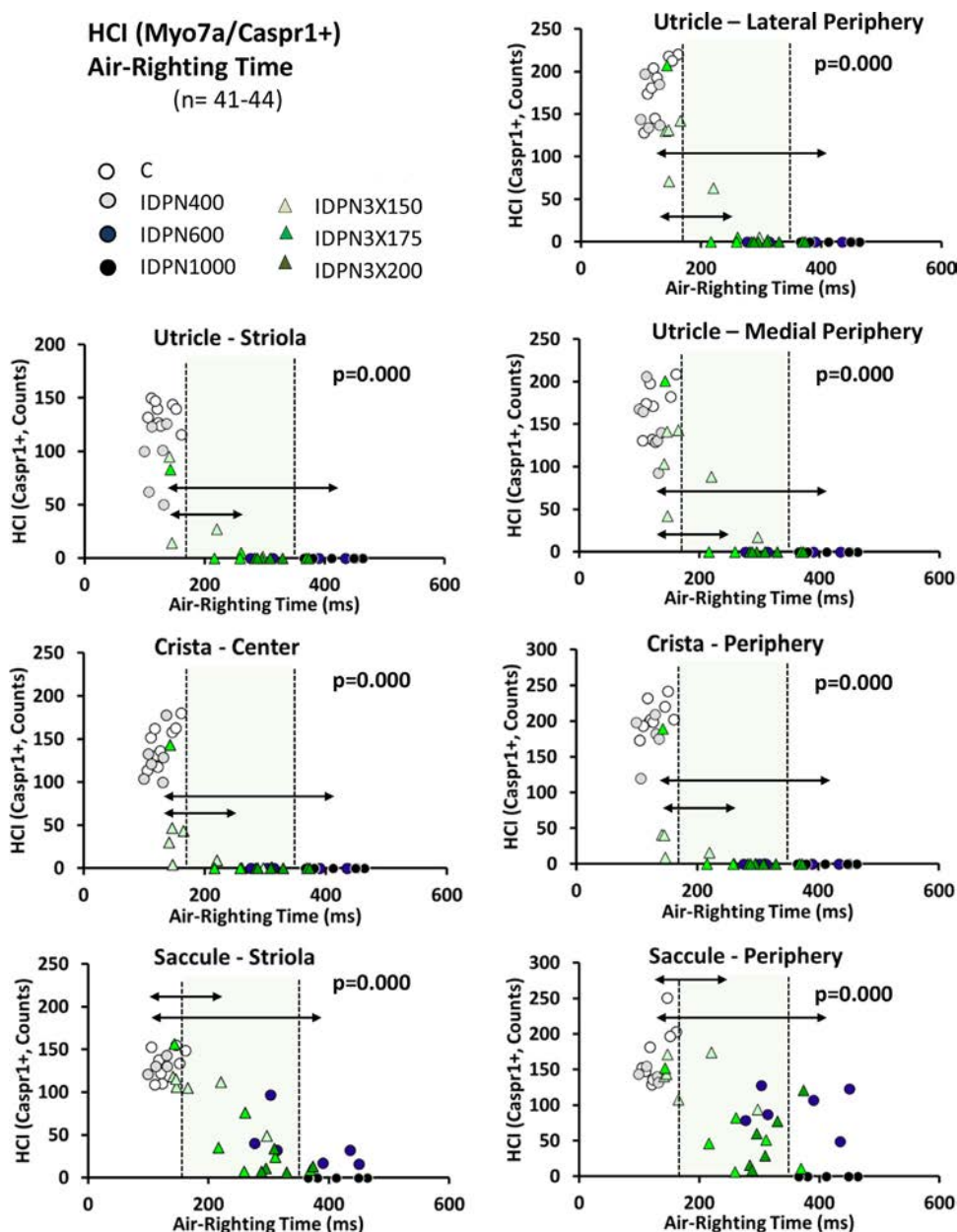


Fig. 8. Relationship between HCl loss and air-righting time increase after exposure to a variety of doses of the ototoxic compound, IDPN, as a function of the zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista and saccule). Individual data shown here correspond to those shown as group means in Fig. 2E-F (times) and Fig. 4 (HCl counts). On each panel, the vertical dashed lines indicate the limits of normal times (170 ms, defined by the Control group) and times in complete absence of vestibular function (350 ms, defined by the IDPN1000 group). These limit values classified rats into three groups with low, medium and high times. The p value in each panel indicates statistical significance among these three groups of rats, after exclusion of the IDPN1000 animals. Double-headed arrows denote significance ($p < 0.05$) of the post-hoc pair-wise comparisons.

because the IDPN1000 animals had virtually no HCs remaining. A striking outcome of the study was the low proportion of animals that showed responses intermediate between those of normal and absent vestibular input. This sharp transition between normal and totally abnormal responses was more marked in the tail-lift than in the air-righting reflexes, but in both cases undermined the power of the statistical analyses. For both reflexes, many animals showed a response identical to that of IDPN1000 rats, that is, one denoting a total absence of vestibular function, while still showing a large proportion of HCs in the vestibular epithelia. For instance, data clouds in Figure 6 reveal that tail-lift angles drop at lower doses than the doses at which HCl numbers start to decrease. One possible explanation of this observation would be that these remaining HCs are not functional. Evidence for non-

functional surviving HCs has been found in an intra-tympanic gentamicin chinchilla model (Hirvonen et al., 2005). It is thus possible that many or all of the surviving HCs detected by immunofluorescence in this study are non-functional for sensory transduction or synaptic transmission. While this hypothesis remains to be evaluated in future studies, some data are available suggesting that surviving cells are indeed functional. First, the relationship between cell counts and reflex abnormalities were different for the two reflexes, indicating that at least some remaining function serves to one but not the other reflex. Second, although a small proportion of HCs surviving acute IDPN show stereocilia damage, most show control-like stereocilia (Llorens et al., 1993; Llorens and Demêmes, 1994; Boadas-Vaello et al., 2017), and stereociliary damage or preservation associates respectively with permanent or

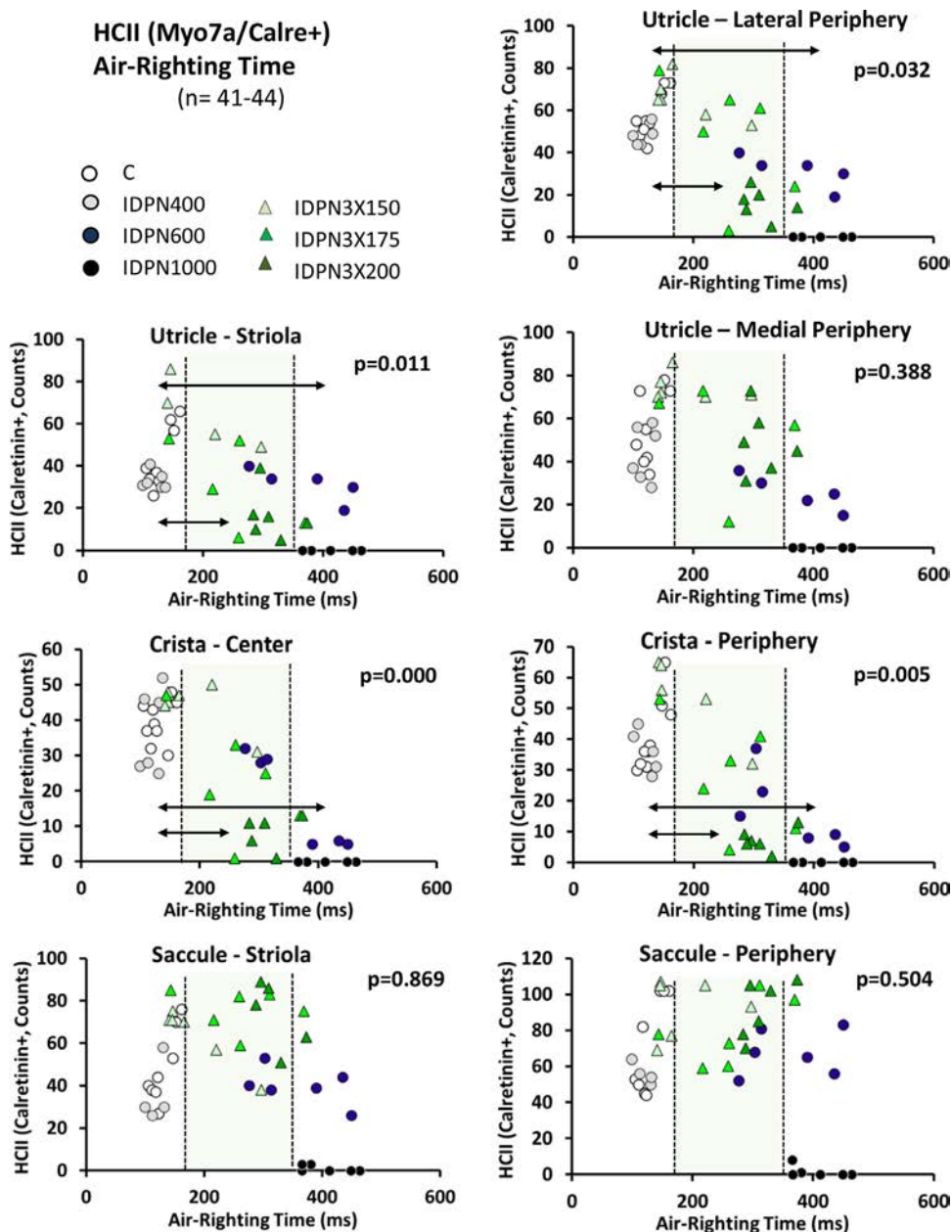


Fig. 9. Relationship between HCII loss and air-righting time increase after exposure to a variety of doses of the ototoxic compound, IDPN, as a function of the zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista and saccule). Individual data shown here correspond to those shown as group means in Fig. 2E-F (times) and Fig. 4 (HCII counts). On each panel, the vertical dashed lines indicate the limits of normal times (170 ms, defined by the Control group) and times in complete absence of vestibular function (350 ms, defined by the IDPN1000 group). These limit values classified rats into three groups with low, medium and high times. The p value in each panel indicates statistical significance among these three groups of rats, after exclusion of the IDPN1000 animals. Double-headed arrows denote significance ($p < 0.05$) of the post-hoc pair-wise comparisons.

versible loss of function after chronic IDPN (Sedó-Cabezón et al., 2015). Third, the normal distribution of Caspr1 label in the calyceal junctions, when these were present, also suggested a normal function, as suggested by the recovery in vestibular function associated with recovery of control-like Caspr1 label after chronic IDPN exposure (Sedó-Cabezón et al., 2015). Finally, maintenance of control-like numbers of synaptic puncta in the surviving HCII cells (Fig. 11) also supported the hypothesis that these cells may remain functional.

One alternative explanation would be that the surviving HCs remain functional but that these reflexes largely depend on a particular subset of vestibular HCs. This subset of cells would be lost at a particular toxicity level, and this would cause a fast drop in

the reflex. Under this hypothesis, the present data provide initial clues to the cellular basis of the reflexes. For instance, the comparison of data in Figs. 5 and 6 strongly suggests that HCl have a greater role than HCII in shaping the tail-lift reflex, as the loss of this reflex seems to occur before the loss of HCII begins. Also, data in Fig. 8 suggest that HCl in the crista and utricle probably have not a major role in the air-righting reflex. Thus, only modest increases in air-righting times were recorded in animals showing a deep-to-complete loss of these cells, and times still showed dose-dependent increases after their complete loss. In relation to this point, we must also indicate that the times to right were interfered by the contact with the foam pad in the rats severely deficient in vestibular function. However, this does not invalidate the observa-

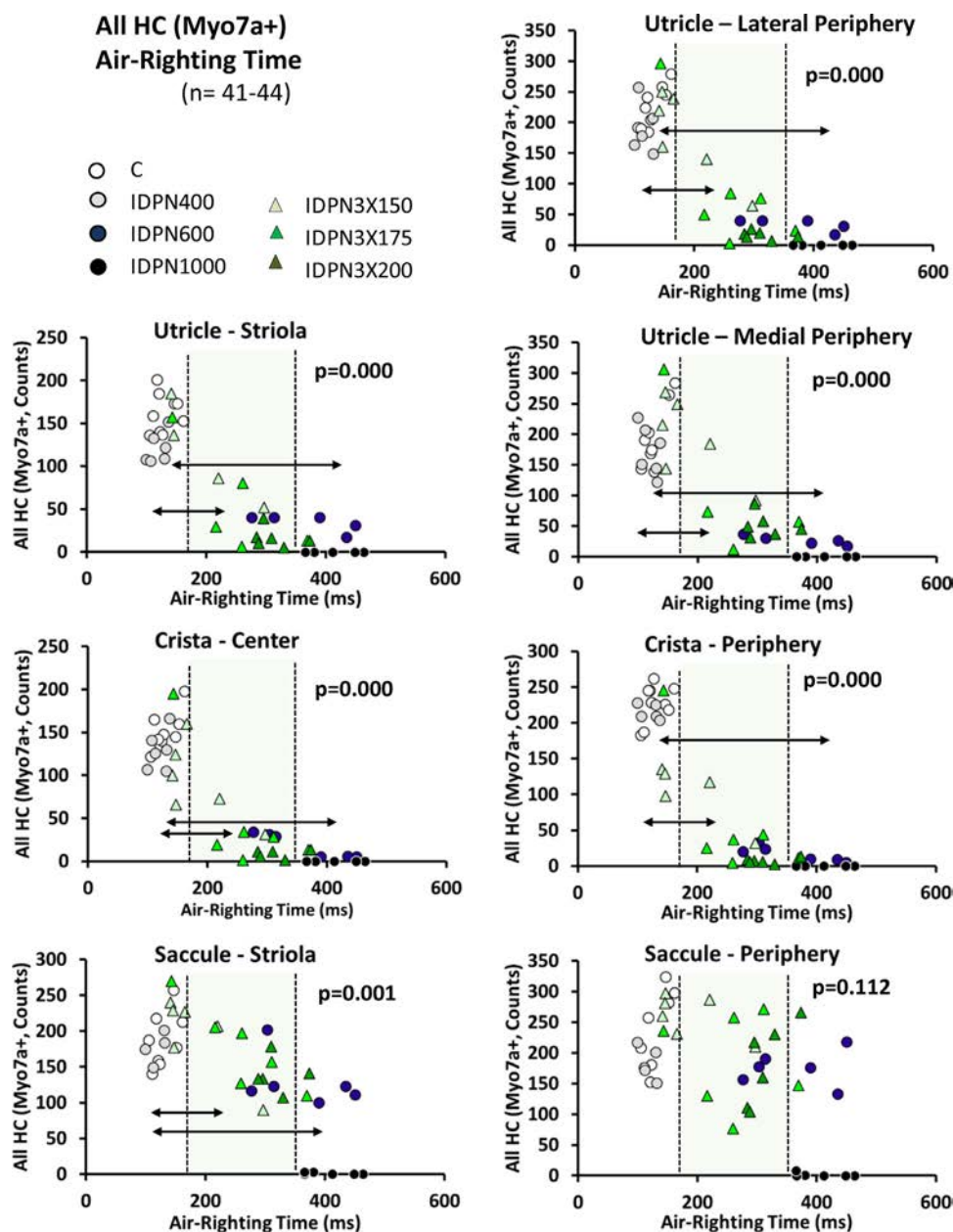


Fig. 10. Relationship between all HC loss and air-righting time increase after exposure to a variety of doses of the ototoxic compound, IDPN, as a function of the zone (central/striola vs periphery) and end-organ (utricle, crista and saccule). Individual data shown here correspond to those shown as group means in Fig. 2E-F (times) and Fig. 4 (all HC counts). On each panel, vertical dashed lines indicate the limits of normal times (170 ms, defined by the Control group) and times in complete absence of vestibular function (350 ms, defined by the IDPN1000 group). These limit values classified rats into three groups with low, medium and high times. The p value in each panel indicates statistical significance among these three groups of rats, after exclusion of the IDPN1000 animals. Double-headed arrows denote significance ($p < 0.05$) of the post-hoc pair-wise comparisons.

tion of nearly normal air-righting in animals bearing a deep HCI loss in the crista and utricle.

The precise role of HCI and HCII in vestibular function has not been completely established yet. However, most evidence supports the notion that the HCI/calyx units are fast adapting receptors specializing in transduction of high frequency stimuli, as needed to generate reflexes that drive fast compensatory actions required to respond to loss of balance (Eatock, 2018). The present study supports the strategy of studying the impact of partial vestibular lesions on behavior to establish hypotheses on the ultimate physiological roles of hair cell types and vestibular sub-systems. Future studies using this approach may benefit from the increasing knowledge of cell and afferent subtypes subdivided by zones as de-

finied by the expression of unique proteins (McInturff et al., 2018; Hoffman et al., 2018), as well as from the use of more complex approaches, such as genetic manipulations (Ono et al., 2020), and the integration of afferent recording (Hirvonen et al., 2005).

Another aspect in need of future research is the extrapolation to other species, most notably the mouse. In view of the known combinations of common features and species-specific differences in vestibular histology and physiology (Boyle et al., 1992; Curthoys et al., 2017; Desai et al., 2005a,b; Eatock, 2018; Goldberg, 2000), it would be premature to assume that the relationship between reflex loss and HC loss will be in the mouse like in the rat. For instance, ventral curling during tail-lift has been reported in many vestibular-deficient mice, but our observations

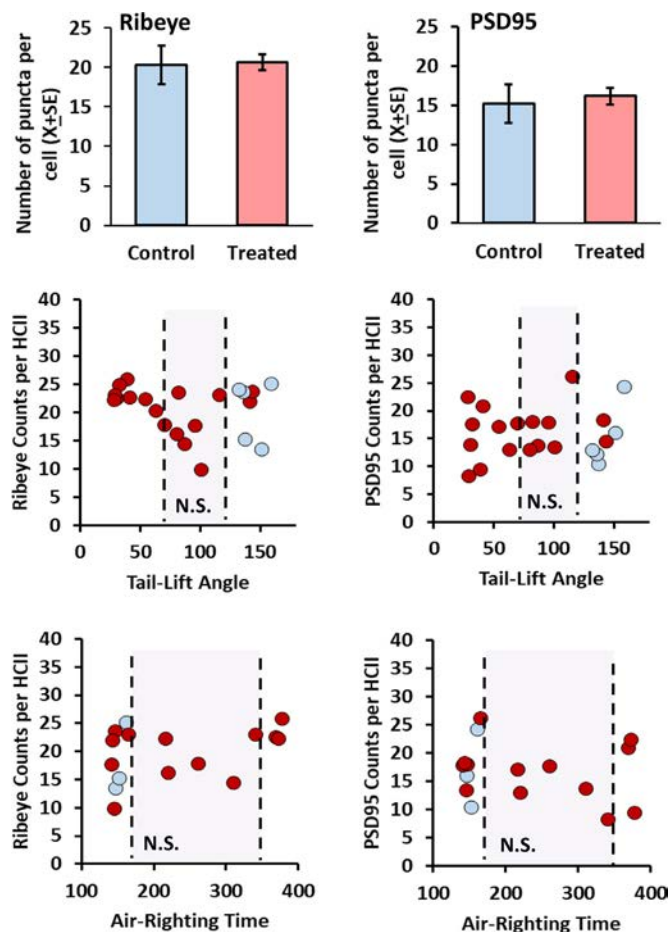


Fig. 11. Counts of pre-synaptic (Ribeye+) puncta and post-synaptic (PSD95+) puncta in HCII of control rats ($n = 5$) and rats with graded vestibular lesions ($n = 17$), selected to cover the spectrum of values of tail-lift angles and air-righting times. Bar graphs show $X \pm SE$ values for control and treated rats, irrespective of the IDPN dose. Middle and bottom panels show the relationship between the behavioral and synaptic data. Blue dots: control rats; red dots: treated rats. Vertical dashed lines show limits defined by control and IDPN1000 rats in tail-lift angles (120 and 70 degrees, respectively, middle panels) and in air-righting times (170 and 350 ms, respectively, bottom panels). N.S.: No significant differences were found in median puncta counts among animals in the three groups defined by the two limit values in angles or times.

after vestibular toxicity in rats (Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Martins-Lopes et al., 2019; this study) and mice (Soler-Martin et al., 2007; Saldaña-Ruiz et al., 2013; Boadas-Vaello et al., 2017; Greguske et al., 2019) suggest that the abnormal tail-lift response more easily and robustly develops in the former than the latter species.

5. Conclusion

The present study compared the loss of vestibular HCs with the loss of anti-gravity reflex responses in rats following graded ototoxicity. While both the tail-lift reflex and the air-righting reflex were affected in a dose-dependent manner, the former was slightly more sensitive than the latter to the toxic damage, suggesting that these two reflexes depend on non-identical populations of HCs. Loss of the tail-lift reflex better associated with loss of HCI, suggesting that this reflex may predominantly depend on HCI function. Additional studies are needed to corroborate this hypothesis, including an evaluation of the functional competence of the surviving cells in the partially damaged vestibular epithelia.

Author statement

Alberto F. Maroto: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Review & Editing, Visualization. Alejandro Barrallo-Gimeno: Formal analysis, Writing - Review & Editing. Jordi Llorens: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft Preparation, Writing - Review & Editing, Visualization, Funding acquisition mmc1.docx mmc2.docx mmc3.docx mmc4.mp4 mmc5.mp4 mmc6.mp4 mmc7.mp4

Acknowledgements

This study was supported by grants RTI2018-096452-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, MCI/AEI/FEDER, UE), and 2017 SGR 621 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya). A.B.G is a Serra-Hünter fellow. The confocal microscopy studies were performed at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). We thank Dr. Benjamin Torrejon for technical assistance, and former students of the laboratory, Anna Bellmunt and Vanessa Martins-Lopes, for their contributions to the study. We also thank Drs. Ruth Anne Eatock and Kazuya Ono for their critical review of the manuscript.

References

- 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.* 60, 182–203.
- Beraneck, M, Bojados, M, Le Séac'h, A, Jamon, M, Vidal, PP, 2012. Ontogeny of mouse vestibulo-ocular reflex following genetic or environmental alteration of gravity sensing. *PLoS One* 7, e40414. doi:10.1371/journal.pone.0040414.
- Boadas-Vaello, P, Sedó-Cabezón, L, Verdú, E, Llorens, J, 2017. Strain and sex differences in the vestibular and systemic toxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in Mice. *Toxicol. Sci.* 156, 109–122.
- Boyle, R, Goldberg, JM, Highstein, SM, 1992. Inputs from regularly and irregularly discharging vestibular nerve afferents to secondary neurons in squirrel monkey vestibular nuclei. III. correlation with vestibulospinal and vestibuloocular output pathways. *J. Neurophysiol.* 68, 471–484.
- Cassel, R, Bordiga, P, Carcaud, J, Simon, F, Beraneck, M, Le Gall, A, Benoit, A, Bouet, V, Philoxene, B, Besnard, S, Watabe, I, Pericat, D, Hautefort, C, Assie, A, Tonetto, A, Dyhrfeld-Johnsen, J, Llorens, J, Tighilet, B, Chabbert, C, 2019. Morphological and functional correlates of vestibular synaptic deafferentation and repair in a mouse model of acute-onset vertigo. *Dis. Model. Mech.* 12 (7). doi:10.1242/dmm.039115, pii: dmm039115.
- Corneil, BD, Camp, AJ, 2018. Animal models of vestibular evoked myogenic potentials: the past, present, and future. *Front. Neurol.* 9, 489. doi:10.3389/fneur.2018.00489.
- Crofton, KM, Knight, T, 1991. Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 13, 575–581.
- Crofton, KM, Janssen, R, Prazma, J, Pulver, S, Barone Jr., S, 1994. The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: Functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hear. Res.* 80, 129–140.
- Curthoys, IS, Vulovic, V, Manzari, L, 2012. Ocular vestibular-evoked myogenic potential (oVEMP) to test utricular function: neural and oculomotor evidence. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 32, 41–45.
- Curthoys, IS, Grant, JW, Burgess, AM, Pastras, CJ, Brown, DJ, Manzari, L, 2018. Otolithic receptor mechanisms for vestibular-evoked myogenic potentials: a review. *Front. Neurol.* 9, 366. doi:10.3389/fneur.2018.00366.
- Curthoys, IS, MacDougall, HG, Vidal, P-P, de Waele, C, 2017. Sustained and transient vestibular systems: a physiological basis for interpreting vestibular function. *Front. Neurol.* 8, 117. doi:10.3389/fneur.2017.00117.
- De Jeu, M, De Zeeuw, CI, 2012. Video-oculography in mice. *J. Vis. Exp.* 65, e3971. doi:10.3791/3971.
- Dechesne, CJ, Winsky, L, Kim, HN, Goping, G, Vu, TD, Wenthold, RJ, Jacobowitz, DM, 1991. Identification and ultrastructural localization of a calretinin-like calcium-binding protein (protein 10) in the guinea pig and rat inner ear. *Brain Res.* 560, 139–148.
- Desai, SS, Zeh, C, Lysakowski, A., 2005a. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Saccular and utricular maculae. *J. Neurophysiol.* 93, 251–266.
- Desai, SS, Ali, H, Lysakowski, A., 2005b. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares. *J. Neurophysiol.* 93, 267–280.
- Desmadryl, G, Dechesne, CJ, 1992. Calretinin immunoreactivity in chinchilla and guinea pig vestibular end organs characterizes the calyx unit subpopulation. *Exp. Brain Res.* 89, 105–108.

- Eatock, RA, 2018. Specializations for fast signaling in the amniote vestibular inner ear. *Integr. Comp. Biol.* 58, 341–350.
- Eatock, RA, Songer, JE, 2011. Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 501–534.
- Fettiplace, R, Nam, JH, 2019. Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells. *Hear. Res.* 376, 11–21.
- Goldberg, JM, 2000. Afferent diversity and the organization of central vestibular pathways. *Exp. Brain Res.* 130, 277–297.
- Granados, O, Meza, G, 2005. Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin *in vivo*, is vestibulotoxic in rats. *Histol. Histopathol.* 20, 357–364.
- Greguske, EA, Carreres-Pons, M, Cutillas, B, Boadas-Vaello, P, Llorens, J, 2019. Calyx junction dismantlement and synaptic uncoupling precede hair cell extrusion in the vestibular sensory epithelium during sub-chronic 3,3'-iminodipropionitrile ototoxicity in the mouse. *Arch. Toxicol.* 93, 417–434.
- Hasson, T, Gillespie, PG, Garcia, JA, MacDonald, RB, Zhao, Y, Yee, AG, Mooseker, MS, Corey, DP, 1997. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.* 137, 1287–1307.
- Halmagyi, GM, Chen, L, MacDougall, HG, Weber, KP, McGarvie, LA, Curthoys, IS, 2017. The video head impulse test. *Front. Neurol.* 8, 258. doi:10.3389/fneur.2017.00258.
- Hirvonen, TP, Minor, LB, Hullar, TE, Carey, JP, 2005. Effects of intra-tympanic gentamicin on vestibular afferents and hair cells in the chinchilla. *J. Neurophysiol.* 93, 643–655.
- Hoffman, LF, Choy, KR, Sultemeier, DR, Simmons, DD, 2018. Oncomodulin expression reveals new insights into the cellular organization of the murine utricle striola. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 19, 33–51.
- Hunt, M.A., Miller, S.W., Nielson, H.C., Horn, K.M., 1987. Intratympanic injections of sodium arsenite (atoxil) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav. Neurosci.* 101, 427–428.
- Imai, T, Takimoto, Y, Takeda, N, Uno, A, Inohara, H, Shimada, S, 2016. High-speed video-oculography for measuring three-dimensional rotation vectors of eye movements in mice. *PLoS One* 11, e0152307. doi:10.1371/journal.pone.0152307.
- Lee, JH, Park, C, Kim, SJ, Kim, HJ, Oh, GS, Shen, AH, So, HS, Park, R, 2013. Different uptake of gentamicin through TRPV1 and TRPV4 channels determines cochlear hair cell vulnerability. *Exp Mol Med* 45, e12. doi:10.1038/emm.2013.25.
- Lindeman, H.H., 1969. Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol.* 67, 177–189.
- Llorens, J, 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, 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, Rodríguez-Farré, E, 1997. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 117–127.
- 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.* 31, 10101–10114.
- Lopez, I, Honrubia, V, Lee, S.C., Schoeman, G, Beykirch, K, 1997. Quantification of the process of hair cell loss and recovery in the chinchilla crista ampullaris after gentamicin treatment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 447–461.
- Maroto, AF, Greguske, EA, Deulofeu, M, Boadas-Vaello, P, Llorens, J, 2021. Behavioral assessment of vestibular dysfunction in rats. *Experimental Neurotoxicology Methods, Neuromethods*, 172. Springer US Llorens J and Barenys M Editorspp xxx-xxx.
- Martins-Lopes, V, Bellmunt, A, Greguske, EA, Maroto, AF, Boadas-Vaello, P, Llorens, J, 2019. Quantitative assessment of anti-gravity reflexes to evaluate vestibular dysfunction in rats. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 20, 553–563.
- McInturff, S, Burns, JC, Kelley, MW, 2018. Characterization of spatial and temporal development of Type I and Type II hair cells in the mouse utricle using new cell-type-specific markers. *Biol. Open* 7, bio038083. doi:10.1242/bio.038083.
- Nakayama, M, Riggs, LC, Matz, GJ, 1996. Quantitative study of vestibulotoxicity induced by gentamicin or cisplatin in the guinea pig. *Laryngoscope* 106, 162–167.
- Ono, K, Keller, J, López Ramírez, O, González Garrido, A, Zobeiri, OA, Chang, HHV, Vijayakumar, S, Ayiotis, A, Duester, G, Della Santina, CD, Jones, SM, Cullen, KE, Eatock, RA, Wu, DK, 2020. Retinoic acid degradation shapes zonal development of vestibular organs and sensitivity to transient linear accelerations. *Nat. Commun.* 11, 63. doi:10.1038/s41467-019-13710-4.
- Pellis, SM, Pellis, VC, Morrissey, TK, Teitelbaum, P, 1989. Visual modulation of vestibularly-triggered air-righting in the rat. *Behav. Brain Res.* 35, 23–26.
- Pellis, SM, Pellis, VC, Teitelbaum, P, 1991. Labyrinthine and other supra-spinal inhibitory controls over head-and-body ventro flexion. *Behav. Brain Res.* 46, 99–102.
- Pujol, R, Pickett, SB, Nguyen, TB, Stone, JS, 2014. Large basolateral processes on type II hair cells are novel processing units in mammalian vestibular organs. *J. Comp. Neurol.* 522, 3141–3159.
- Saldaña-Ruiz, 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.* 14, 661–671.
- Sedó-Cabezón, L, Jedynak, P, Boadas-Vaello, P, Llorens, J, 2015. Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis. Model. Mech.* 8, 1323–1337.
- 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.* 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 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.
- Sousa, AD, Andrade, LR, Salles, FT, Pillai, AM, Buttermore, ED, Bhat, MA, Kachar, B, 2009. The septate junction protein caspr is required for structural support and retention of KCNQ4 at calyceal synapses of vestibular hair cells. *J. Neurosci.* 29, 3103–3108.
- Sultemeier, DR, Hoffman, LF, 2017. Partial aminoglycoside lesions in vestibular epithelia reveal broad sensory dysfunction associated with modest hair cell loss and afferent calyx retraction. *Front. Cell Neurosci.* 11, 331. doi:10.3389/fncel.2017.00331.
- Wilkerson, BA, Artoni, F, Lea, C, Ritchie, K, Ray, CA, Bermingham-McDonogh, O, 2018. Effects of 3,3'-iminodipropionitrile on hair cell numbers in cristae of CBA/Caj and C57BL/6j Mice. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 19, 483–491.

Evaluation of Cellular and Molecular Pathology in the Rodent Vestibular Sensory Epithelia by Immunofluorescent Staining and Confocal Microscopy

Alberto F. Maroto, Erin A. Greguske, Alejandro Barrallo-Gimeno, and Jordi Llorens

Experimental Neurotoxicology Methods, Chapter 3



Evaluation of Cellular and Molecular Pathology in the Rodent Vestibular Sensory Epithelia by Immunofluorescent Staining and Confocal Microscopy

Alberto F. Maroto, Erin A. Greguske, Alejandro Barrallo-Gimeno, and Jordi Llorens

Abstract

Hair cells in the vestibular and cochlear sensory epithelia are the main target of ototoxic drugs. Nevertheless, the synapses between the hair cells and the afferent terminals of the post-synaptic ganglion neurons have also been shown to be a target of ototoxic damage. In this chapter, we describe immunohistochemistry protocols adapted to the quantification of hair cells and synapses in the vestibular epithelia to assess ototoxic damage in rodents. Epithelia are immunolabeled intact and are used in whole-mount preparations for the quantification of hair cell numbers by confocal microscopy imaging. For synaptic assessment, the epithelia are first immunolabeled, embedded in a gelatin/albumin block, and then sectioned in a vibrating microtome before confocal microscopy imaging. The data thus obtained offer a thorough evaluation of the damage suffered by the vestibular sensory epithelia, including overt hair cell loss and subtle synaptic loss. Together, these pathological outcomes determine the loss vestibular input and the resulting behavioral alterations.

Key words Ototoxicity, Immunohistochemistry, Confocal microscopy, Vestibular epithelia, Hair cell, Synaptic uncoupling

1 Introduction

1.1 Hair Cell and Synapse Counts in the Vestibular Sensory Epithelia Following Ototoxic Damage

The vestibular system in the inner ear, also known as labyrinth, detects head accelerations resulting from body movements and gravity [1]. It provides both dynamic and static information for equilibrium and gaze control, as well as for the sense of orientation in space. Vestibular dysfunctions cause disequilibrium and loss of gaze control and are accompanied by vertigo, dizziness, impaired visual acuity, compromised motor competence, falls, and other disabilities. One possible cause of vestibular loss is exposure to toxic chemicals that target both the vestibular and the auditory systems, hence named ototoxic compounds [2]. Besides their shared location in the inner ear, the vestibular and the auditory

systems rely for sensory transduction on subtypes of a common cellular type, the hair cell (HC). HCs are specialized epithelial cells characterized by bundles of apical specializations, known as stereocilia, that protrude into fluid-filled cavities and contain the molecular machinery for mechano-electrical transduction [3]. Well known ototoxic compounds include clinically important drugs, such as aminoglycoside antibiotics and the chemotherapeutic drug cisplatin. Several different aminoglycosides have clinical use and all of them are ototoxic although some are more toxic to the auditory system and others, notably gentamicin and streptomycin, affect more the vestibular system. These drugs cause HC degeneration and often permanent loss of function because the ability of HCs to regenerate is null or very limited [4].

In animal models of ototoxicity, counts of sensory HC numbers are obtained for different purposes, such as to evaluate ototoxic potency of drugs, to assess the potential benefit of candidate protective agents that could have clinical utility by reducing the extent of damage, or to measure the efficacy of treatments aimed at activating HC regeneration [5]. In addition, there is growing interest in obtaining counts of synaptic contacts between the HCs and their post-synaptic afferents. Although the HCs are likely the primary target of ototoxic drugs, recent research has revealed that loss of synaptic contacts, referred to as synaptic uncoupling, may account for a significant part of the functional loss in particular ototoxicity models, depending on the ototoxic compound and mode and duration of exposure [6–9].

1.2 Functional and Structural Diversity in Vestibular Epithelia and Differential Vulnerability to Ototoxic Damage

Two types of HCs are identified in the vestibular sensory epithelia (Fig. 1). Type I HCs (HCI) have an amphora-like shape and are encased up to their neck by a remarkable structure, a calyx-shaped afferent terminal. In the lower two-third of the basolateral membrane of the HCI, the contact between the cell and the inner membrane of the calyx shows an adhesion complex, the calyceal junction, that is characterized at the transmission electron microscopy level as a symmetric densification of the plasma membrane, a greater than normal regularity in the distance between the membranes, and an electro-dense appearance of the extracellular space [10, 11]. Type II HCs (HCII) have a more columnar form and are contacted by bouton afferent terminals that are like regular synaptic boutons found elsewhere in the nervous system. Like HCs in the cochlea and photoreceptors and bipolar cells in the retina, both types of vestibular HCs are associated with a unique structure located in the pre-synaptic active zone, the synaptic ribbon. The ribbon likely contributes to the fast release and/or recycling of the synaptic vesicles thus enabling continuous, robust release of neurotransmitter [12]. The neurotransmitter in these synapses is glutamate, and post-synaptic sites contain ionotropic AMPA-type glutamate receptors clustered in post-synaptic densities [6, 8, 9,

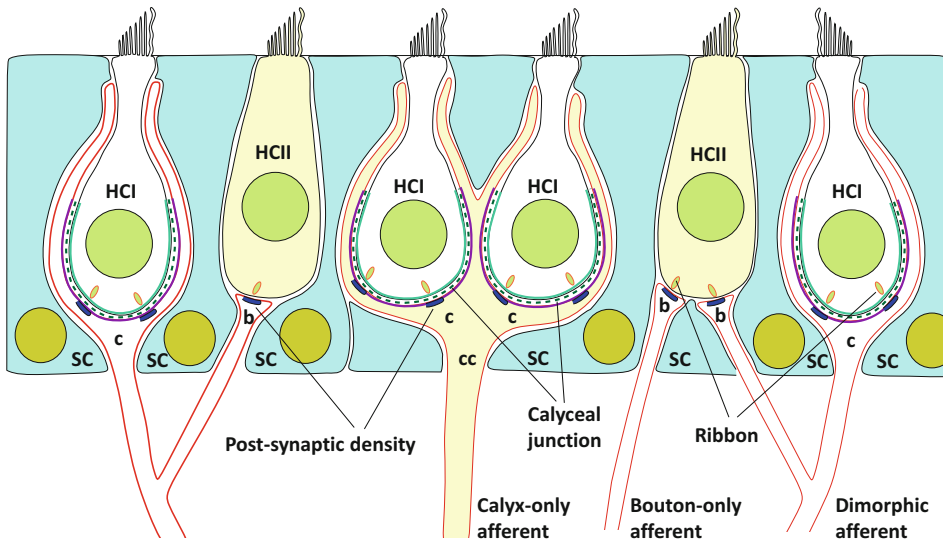


Fig. 1 Schematic of the various cell types and afferent endings in the vestibular epithelium. The epithelium consists of hair cells (HC), characterized by the stereocilia bundles on their apical surfaces, and supporting cells (SC). Type I HCs (HCI) have an amphora-like shape, are encased by calyceal afferent terminals (c), and show a prominent adhesion complex with this terminal, the calyceal junction. Type II HCs (HCII) are more cylindrical and are contacted by bouton terminals (b). Synaptic contacts are discrete structures, identified by pre-synaptic ribbons and post-synaptic densities. Three types of afferents are found: (1) calyx-only afferents, often forming complex calyces (cc) that encase 2 or 3 HCI; (2) bouton-only afferents, contacting only HCII; and (3) dimorphic afferents that form both calyceal and bouton type terminals

13]. Although there are two major types of HCs and two types of afferent terminals, three classes of afferents can be differentiated [14]. These are: (1) calyx-only afferents that form calyx terminals only and often form complex calyces that engulf two or more HCIs; (2) bouton-only afferents that form bouton terminals on HCII; and (3) dimorphic afferents that form both calyx terminals on HCI and bouton terminals on HCII.

Each human or rodent ear contains five vestibular sensory epithelia: three cristae, one in each of three semicircular canals, and two maculae in the utricle and saccule (Fig. 2). While the overall structures of the epithelia are similar in all vestibular end organs, there are regional differences within and among them, especially between the central and peripheral zones of each epithelium [14–17]. The stereocilia bundles are polarized structures, and their orientation reverses at approximately the central line of the utricular macula and the saccular macula, known as the striola. The peri-striolar (central) zone of these maculae is characterized by a higher density of HCI and denser innervation by calyx-only terminals. In the periphery of the maculae, HCII are more abundant and HCI are contacted by calyces that arise from dimorphic afferents. The crista receptors do not have a striola because all HCs in a crista

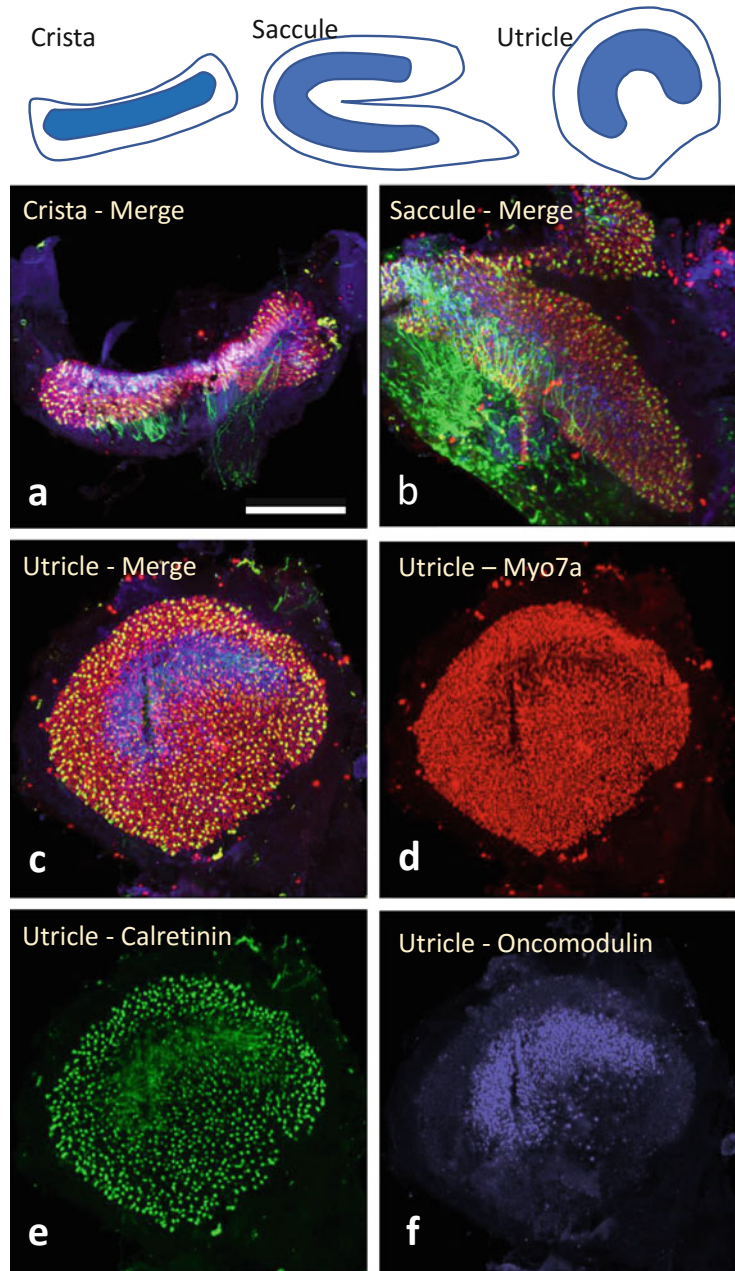


Fig. 2 Diversity of the vestibular sensory epithelia within specific end organs. The top drawings are schemas of the crista saccule and utricle, with the central part of the crista and peri-striolar part of the saccule and utricle shown in solid color. The bottom panels show confocal images of these epithelia (**a**: crista; **b**: saccule; **c–f**: utricle) labeled with antibodies against Myo7a (all HCs; red), calretinin (HCII and calyx-only afferents; green) and oncomodulin (HCs in central/peri-striolar zones; blue), as indicated within the figures. The scale bar in a is 100 μ m and applies to all panels

show the same orientation. They do have a central (apical) part with equivalent features to the peri-striolar zone of the maculae, and a periphery similar to the periphery of the maculae. One of the most striking differences between end organs is the length of the stereocilia, which are much longer in cristae than in maculae. These morphological differences associate with still poorly characterized biochemical and physiological differences.

One consistent observation across most experimental studies of vestibular toxicity is the differential sensitivity of the different end organs, zones, and cell types to different ototoxic compounds, including aminoglycosides and nitriles [18–21]. In dose–response or time–course studies, damage typically progresses in the following orders: crista > utricle > saccule, central > peripheral and HCI > HCII. Thus, HCI contacted by calyx-only afferents in the apical part of the crista show the highest sensitivity, degenerating at the minimally effective doses. Subsequently, at nearly maximal doses, only a few cells survive the ototoxic treatment, and these are typically HCII in the peripheral zones of the saccule.

1.3 Use of Immunofluorescent Labeling to Assess HC and Synaptic Loss

While scanning electron microscopy observation of the vestibular epithelia surfaces offers a direct overall view of vestibular HC loss [19, 22], immunofluorescent labeling, and subsequent assessment by confocal microscopy together offer the best approach to quantify loss of HCs by type and synaptic damage. This approach relies on knowledge of proteins selectively expressed in each type of HC or in discrete subcellular structures, and the availability of dependable antibodies against these proteins. The most common marker used to selectively label HCs for quantification is the unconventional myosin VIIa (Myo7a) [23]. HC nuclei have also been successfully labeled for HC quantification with antibodies against the transcription factor Gfi1b [5]. Antibodies against other proteins allow differentiation between HC types. HCIs have been shown to selectively express secreted phosphoprotein 1 (SPP1)/osteopontin [17, 24], while most HCII express calretinin [15]. Calyx-only afferents also express calretinin while bouton-only and dimorphic afferents do not [25]. Calyx terminals, and, indirectly HCI, can be visualized by labeling proteins characterizing the calyceal junction, either the adhesion molecule contactin-associated protein 1 (Caspr1), found in the afferent membrane [6, 9, 11, 16], or the extracellular matrix protein, tenascin-C [6, 9, 16].

Synaptic contacts can be recognized as close pairs of pre- and post-synaptic puncta. The core component of the pre-synaptic ribbon is ribeye, a protein encoded by the same gene encoding the transcription factor C-terminal binding protein 2 (CtBP2) [26]. The post-synaptic density is rich in the post-synaptic density protein 95 (PSD-95), a scaffold protein necessary for the clustering of the glutamate AMPA receptors [27]. Shank1A is another protein that characterizes the post-synaptic density [28, 29]. Although

mRNA expression data [30] suggest that these may contain GluA2, GluA3, and GluA4, but not GluA1 subunits, so far only the GluA2 subunit has been clearly labeled in the vestibular synapses [6, 9].

1.4 Labeling of the Vestibular Sensory Epithelia

Immunofluorescent labeling is a routine procedure in many laboratories, and each laboratory optimizes the basic protocols for their needs, determined by the tissues to be examined and the properties of the antibodies to be used. This chapter will describe the protocols optimized in our laboratory to assess the number of HCs, including separate counts for HCI and HCII, and the number of synaptic contacts.

To study the vestibular epithelia, the traditional approach of labeling tissue sections on slides requires these tiny tissues to be embedded in an appropriate medium to form a block for sectioning. Embedding can be done with a medium for cryostat sectioning or with agar for sectioning at the vibrating microtome [31]. The vibratome sections can also be used for free floating labeling [32]. However, the vestibular sensory epithelia are thin enough to allow whole mount immunolabeling and imaging by confocal microscopy through their entire thickness. Therefore, this has become in recent years the most common approach to evaluate HCs and their synaptic densities [7, 8]. Nevertheless, imaging of epithelial cross-sections may be useful for a meticulous investigation of synapses and, for this purpose, we combine whole mount immunolabeling with sectioning of the epithelium labeling [6, 9]. To obtain the sections, we embed the labeled epithelia in gelatin/albumin blocks as often done with zebrafish and *Xenopus* embryos [33]. The immunolabeling protocol mostly follows that described by Lysakowski et al. in 2011 [16].

2 Materials

2.1 For Sample Processing and Immuno- histochemistry

- Freshly depolymerized paraformaldehyde, 4% in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 (*see Note 1*).
- Cryoprotective solution: 34.5% glycerol, 30% ethylene glycol, 20% PBS, 15.5% distilled water.
- Triton-X-100 (Sigma-Aldrich).
- Gelatin from cold water fish skin, CAS #9000-70-8 (Sigma-Aldrich).
- Mounting medium suitable for fluorescence imaging, such as Mowiol.
- Microscope slides and coverslips.
- Primary antibodies (Table 1).
- Fluorochrome-conjugated secondary antibodies. These can be selected as appropriate for the primary antibodies from a large

Table 1
Antibodies

Target	Host and type	Reference and source	Working dilution
Calretinin	Guinea pig, polyclonal	214 104, Synaptic Systems	1/500
Calretinin	Rabbit, polyclonal	CR7697, Swant	1/1000
Caspr1	Mouse, monoclonal (IgG1)	Clone K65/35, Neuromab	1/400
GluA2	Mouse, monoclonal (IgG2a)	Clone 6C4, MAB397 Millipore	1/100
Myosin VIIa	Mouse, monoclonal (IgG1)	Clone 138-1-s, DSHB	1/100
Myosin VIIa	Rabbit, polyclonal	25-6790, Proteus Biosciences	1/400
Oncomodulin	Rabbit, polyclonal	OMG4, Swant	1/400
PSD-95	Mouse, monoclonal (IgG2a)	Clone K28/43, Neuromab	1/100
Ribeye	Mouse, monoclonal (IgG1)	Clone 16/CtBP2, BD Biosciences	1/200
SPP1	Goat, polyclonal	AF808, R&D Systems	1/200
Tenascin	Rabbit, polyclonal	AB19013, Millipore	1/200

variety of available choices. For the present protocols, we use the following secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor fluorochromes: 488 goat anti-guinea-pig IgG H + L (catalog #A11073, Invitrogen/ThermoFisher), 555 donkey anti-rabbit IgGs H + L (#A-31572), 555 goat anti-mouse IgG2a (#A21137), 647 goat anti-mouse IgG1 (#A21240), and 654 donkey anti-mouse IgG H + L (catalog #A-21202). We also use the DyLight 405 donkey anti-rabbit IgG H + L (catalog #711-475-152, Jackson ImmunoResearch) (*see Note 2*).

- Appropriate nuclear fluorescent stain (i.e., 4',6-diamidino-2-phenylindole/DAPI).

2.2 For Post-Labeling Sectioning

- Gelatin/albumin mixture for post-labeling inclusion and sectioning of the vestibular epithelia: 0.49 g alimentary gelatin, 30 g bovine serum albumin, 20 g sucrose, 100 mL of 0.1 M PBS (*see Note 3*).
- Glutaraldehyde 25%.
- Small molds. We use 1 cm long cylinders obtained by two transverse cuts of 2 mL Eppendorf tubes.
- Vibrating microtome.

2.3 For Confocal Imaging and Image Analysis

- Confocal microscope suitable for 4-color channel image acquisition. The images in this chapter were acquired in a Zeiss LSM880 spectral microscope.

- Microscopy image analysis software. We use both Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) and Imaris (Bitplane).

3 Methods

3.1 Immunohistochemistry Protocol

- Fix the vestibular epithelia in 4% PFA for 1 h.
- Rinse the samples in PBS (2 × 10 min) and use immediately or store at −20 °C in cryoprotective solution. For storage, the samples are placed in the solution at room temperature, then placed at 4 °C for 2 h for effective embedding before storage in the freezer. To use these samples, allow them to return to room temperature and rinse with PBS (2 × 10 min). We have successfully used samples stored in this way for up to 8 years.
- All the following steps are performed using slow agitation.
- Incubate samples for 1 h with 500μL of 4% Triton X-100 in PBS for permeabilization (*see Note 4*).
- Incubate samples for 1 h with 500μL of 0.5% Triton X-100 and 1% of fish gelatin in PBS for blocking (*see Note 5*).
- Incubate primary antibodies in 200μL of 0.1% Triton X-100 and 1% fish gelatin in PBS for 24 h at 4 °C. Details of the primary antibodies are shown in Table 1. We use two different combinations:
 - A: To obtain counts of HCI and HCII, we use the rabbit anti-Myo7a antibody to label all HCs, the guinea-pig anti-calretinin to label HCII and the mouse monoclonal anti-Caspr1 antibody to label calyceal junctions and thus identify HCI.
 - B: To quantify synaptic contacts, we use the rabbit anti-Myo7a antibody to label all HCs, the guinea-pig anti-calretinin to label HCII, the mouse IgG1 anti-ribeye antibody to label pre-synaptic ribbons and the mouse IgG2a anti-PSD95 to label post-synaptic densities.
- Rinse with 500μL of PBS (4 × 10 min).
- Incubate secondary antibodies in 200μL of 0.1% Triton X-100, 1% fish gelatin in PBS for 24 h at 4 °C in agitation. In this and following steps, the incubations are protected from light exposure by wrapping the culture plate with aluminum foil. We use the following combinations of Alexa Fluor conjugated secondary antibodies, selected for the corresponding combinations of primary antibodies:
 - A: 488 anti-mouse, 555 anti-rabbit and 647 anti-guinea pig.
 - B: 405 anti-rabbit, 488 anti-mouse IgG2a, 555 anti-mouse IgG1, and 647 anti-guinea pig.

- Rinse with PBS (2×10 min).
- For combination A only: Incubate with $1\mu\text{L}/\text{mL}$ DAPI in PBS (15 min).
- Rinse with PBS (4×5 min).

At this step, the vestibular epithelia can be mounted on slides as whole mounts or embedded for sectioning as explained in the next subsection. For mounting, we use Mowiol, but commercial mounting media suitable for immunofluorescence can also be used.

3.2 Post-Labeling Inclusion and Sectioning

- Embed epithelia in gelatin/albumin solution overnight at 4°C .
- In an Eppendorf tube, start polymerization of a small volume (e.g., $250\mu\text{L}$) of the gelatin/albumin solution by adding 9% (V/V) of 25% glutaraldehyde. Immediately transfer the mixture into a mold to form the bottom half of the block. Avoid the formation of bubbles. The solidification process can be slowed down if all the reagents are placed previously on ice. Cooling is recommended to facilitate the transfer of the polymerizing solution while avoiding the formation of bubbles.
- The sample should be placed appropriately oriented on the gelatin/albumin solution (Fig. 3a) once the top layer of the solution is firm but still sticky (usually within 5–10 min after adding the glutaraldehyde to the gelatin/albumin solution). Noting the orientation of the epithelia is important because it will determine the orientation for sectioning (*see Note 6*).
- Carefully absorb the excess liquid gelatin/albumin surrounding the sample with a paper towel. Pay special attention that movement of the gelatin/albumin solution does not shift the orientation of the epithelium and that the epithelium does not adhere to the paper towel.
- Draw a diagram with the location and orientation of the sample in the block to facilitate orientation for later sectioning.
- Cover the sample with a second polymerizing solution (Fig. 3b), prepared as described above, to form the upper half of the block. Pour the solution slowly down the walls of the mold to avoid undesired displacement of the sample.
- Let this second layer completely solidify for about 30 min.
- Take the solid block out of the mold and cut it into a rectangular pyramid that contains the sample oriented in the center and near the top (Fig. 3c) to allow transverse sections of the epithelia with the vibrating microtome.
- Store the blocks overnight at 4°C in a 4% paraformaldehyde solution. Cooling and additional fixation increases their stiffness for better sectioning. If stored for 4 or more days, they risk becoming too rigid for proper sectioning.

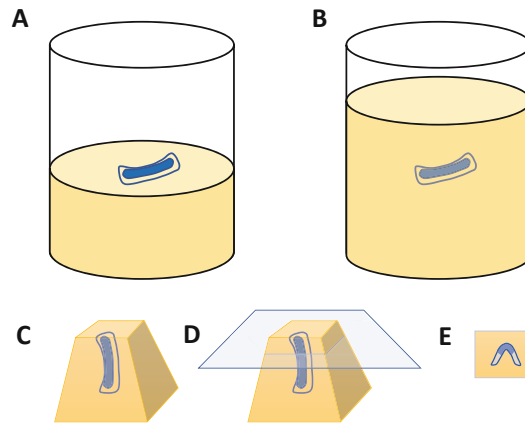


Fig. 3 Schematic of the procedure for post-labeling embedding and sectioning of the vestibular epithelia. **(a)** A crista placed on top of the bottom half of the gelatin/albumin block. **(b)** A second half of the block is formed on top of the first half, so the crista gets included into the block at the limit between the two halves. **(c)** After complete solidification, the block is cut into a pyramid with the sample in the appropriate orientation. **(d)** The block is sectioned horizontally using the vibratome. **(e)** Correctly oriented specimens yield transverse sections of the epithelia that contain both central and peripheral regions of the end organ, crista, or macula

- Section the specimens at $40\mu\text{m}$ in a vibrating microtome (Fig. 3d, e). Mount the sections with the appropriate medium (e.g., Mowiol), coverslip, and store protected from light at 4°C until observation.

3.3 HC and Synapse Counts by Confocal Microscopy and Image Analysis

Sections are observed using a confocal microscope. For quantitative analysis, images are obtained from optimally oriented sections with the $63\times$ (NA: 1.4) objective. For comparisons among groups of animals, the image acquisition settings must be maintained when observing the samples from the different groups of animals within the same batch. To avoid processing bias, the same number of samples from each experimental group must be processed in parallel. Generally, the entire epithelia can be scanned with a continuous Z-stack spanning around $25\mu\text{m}$ with an optical section thickness of around $0.3\mu\text{m}$. Image processing software packages are used for the 3D visualization of stacks.

To obtain separate counts of HCI and HCII, we use combination “A” of primary antibodies, secondary antibodies, and DAPI (Fig. 4). Using this combination, all cell nuclei in the epithelia are labeled with DAPI and the cytoplasm of all HCs is labeled with Myo7a. In addition, the Caspr1 label of the calyceal junctions identifies HCI, and the cytoplasmic calretinin label (overlapping with Myo7a) identifies HCII. The calretinin label of calyx-only afferents in the central areas of the receptors is clearly distinguished

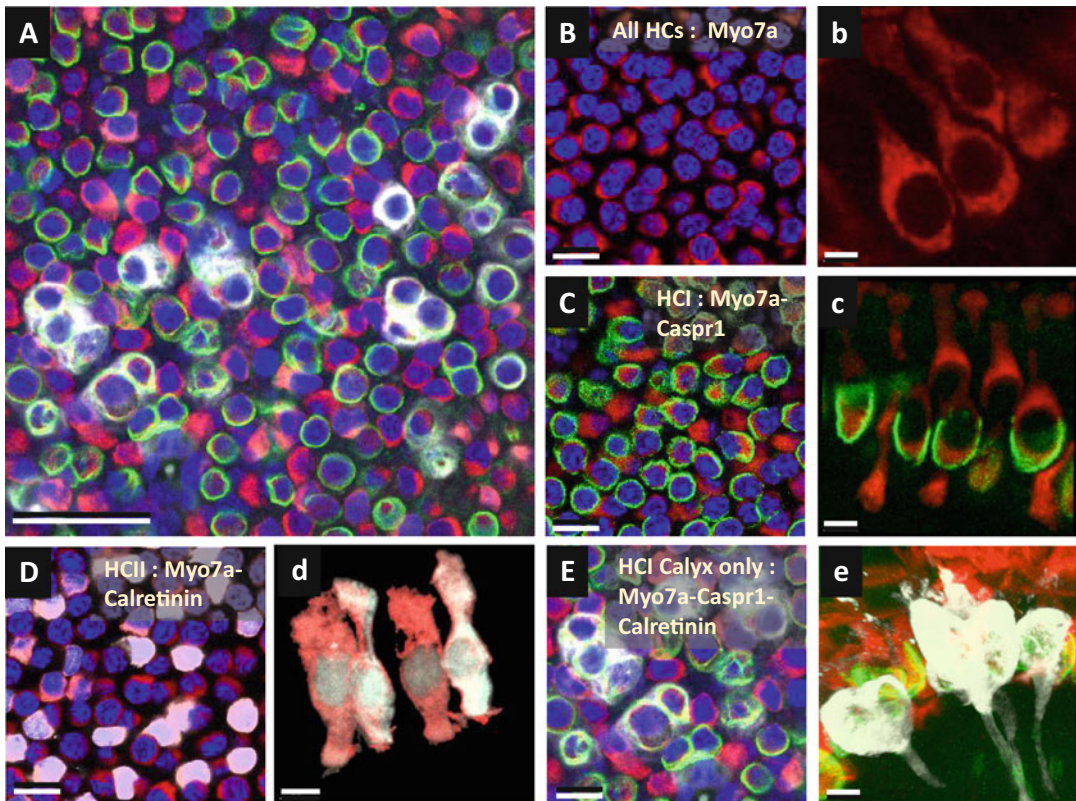


Fig. 4 Immunolabeling for HC counts in whole-mount preparations of the saccular macula. Images show labeling obtained with antibodies against Myo7a (red), Caspr1 (green), and calretinin (white), and the nuclear stain DAPI (blue). **(A)** General view of the striolar area. Other images are paired with letters to show a z-stack compression (capital letter) and a 3D reconstruction in higher magnification (lower case) of all HCs **(B, b)**, HCI **(C, c)**, HCII **(D, d)**, and calyx-only complex afferents encasing two or three HCIs in the striolar zone **(E, e)**. Scale bars = 30 μ m in **A**; 10 μ m in **B, C, D, E**; 5 μ m in **b, c, d, e**

from that of HCIIIs. Since the whole vestibular epithelia is to be analyzed, thick stacks are obtained. To manage these, it is useful to use the Imaris blend option to reduce the opacity of channels and ease the task of counting. This blend option can be found in the 3D visualization mode of Imaris. The filtered images can be counted later with the cell counter plugin of ImageJ.

The “A” combination of primary antibodies is also useful to evaluate the integrity of the calyceal junction between HCIs and calyx afferents. The calyceal junction has been shown to be dismantled and rebuilt in rodent models of chronic ototoxicity and wash-out, consistent with the loss and recovery of function observed in the animals [6, 9]. Enduring damage of the calyces has also been recorded in models of partial ototoxic lesions [7].

For synaptic analysis, we use combination “B” of primary and secondary antibodies (Fig. 5). The Myo7a and calretinin labels allow identification of all HCs, HCII, and calyx-only afferent

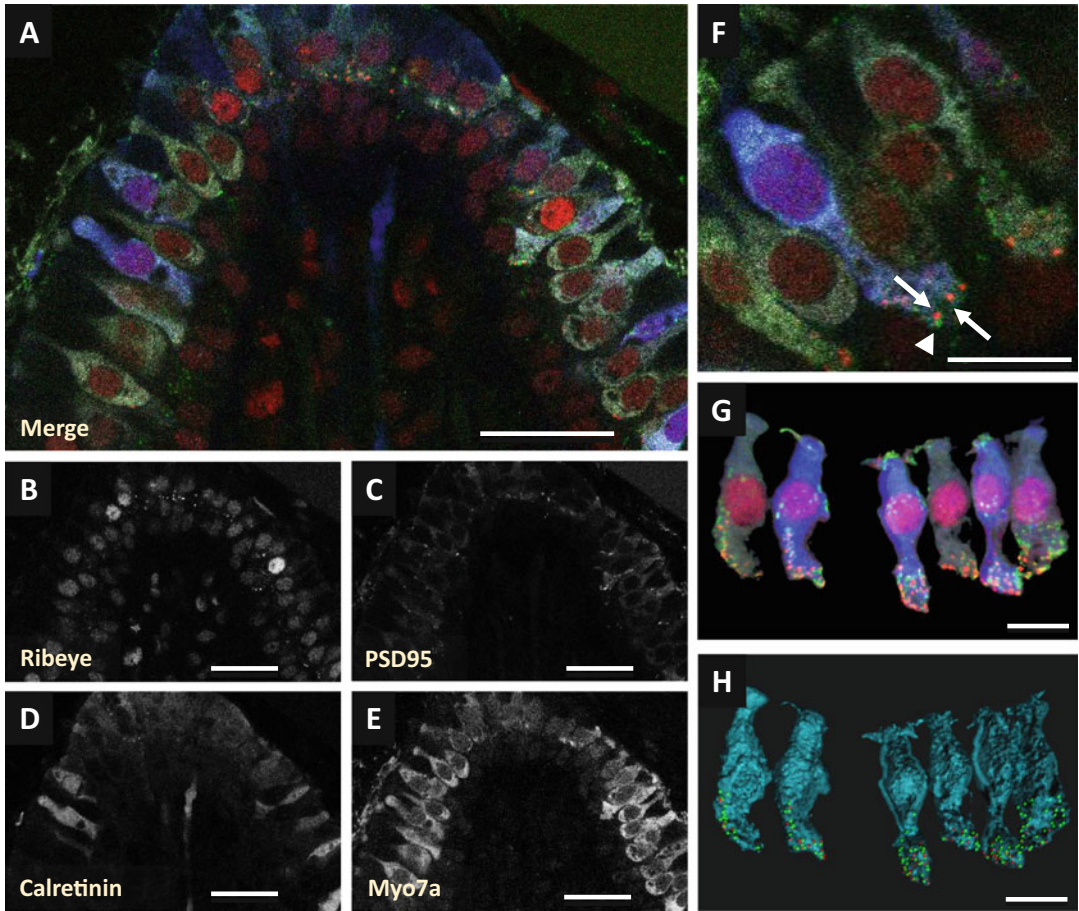


Fig. 5 Detail of a vestibular epithelium (crista) labeled for synapse counts. Confocal microscopy images are taken from 40µm thick transverse sections obtained using a vibrating microtome from a specimen embedded in a gelatin/albumin block. Four color images (**a**) are obtained with fluorescence channels (shown separate in **b–e**) adequate to the conjugate secondary antibodies recognizing the primary antibodies against ribeye (**b**; shown in red in **a**), PSD95 (**c**; shown in green in **a**), calretinin (**d**; shown in blue in **a**), and Myo7a (**e**; shown in white in **a**). Higher magnification of a raw 4-color image where pre-synaptic ribeye puncta (red, arrows) and post-synaptic PSD95 puncta (green, arrowhead) can be observed. (**g**) HCII with synaptic puncta as obtained by HCII segmentation using Imaris software. (**h**) Final 3D image obtained with Imaris of the same cells in G after cell and synaptic puncta recognition. Scale bars = 25µm in **a–e**; 10µm **f–h**

terminals. Pre-synaptic and post-synaptic puncta are labeled with ribeye and PSD-95, respectively. The anti-ribeye antibody also recognizes the transcription factor CtBP2, encoded by the same gene, and additionally labels the HC nuclei. Synaptic analysis is more complex than HC counting, and we use a semi-automated approach in Imaris to facilitate counting and to reduce potential biases. First, the diameters of pre- and post-synaptic components (puncta) are obtained with the measurement tool in the 2D slice visualization. These values are introduced as parameters into the program to aid detection of the puncta. Next, the spot function of

the program is used in the 3D visualization mode. This function identifies the synaptic puncta based on the expected diameters measured previously for each fluorescence channel. Detection of puncta can be further optimized by adjusting the “quality threshold” setting of the spot function. Once selected, the acquisition parameters are maintained for the rest of the experiment to avoid bias during the analysis. To distinguish synapses on HCl and HCII, segmentation of the stack by each cell type is done before the spot analysis step. To this end, the cell functionality of Imaris is used. Adequate recognition of the cells is based on fluorochrome channels and cell diameters.

4 Notes

1. Fixative solutions, including paraformaldehyde and glutaraldehyde, are highly toxic and must be handled with protective equipment under a fume hood.
2. Colors shown in figures have been selected for best visualization and do not correspond to the emission colors of the fluorochromes.
3. Method to prepare the gelatin/albumin solution. In an Erlenmeyer flask, bring the PBS to a boil and dissolve the alimentary gelatin using a magnetic stir bar. Once dissolved, allow it to cool down to room temperature. Then, add the BSA in small fractions while stirring. Wait for each fraction to dissolve completely before adding the next fraction. Adding the BSA to a warm solution will cause it to denature, spoiling the mixture. After dissolving the albumin, add and dissolve the sucrose. The gelatin can be stored in aliquots at -20°C . After thawing, it can be stored at 4°C for up to 3 days.
4. The use of 4% Triton-X-100 for permeabilization of the vestibular epithelia exceeds largely the concentrations used for other tissues, but it has been demonstrated to be optimal for many antibodies in this tissue [16].
5. Fish gelatin has been found to be more effective in reducing background noise than other blocking agents, such as donkey serum, in these immunohistochemical protocols [16].
6. When making the gelatin/albumin blocks, the epithelia are placed flat and the pyramids made with the appropriate orientation to obtain transverse sections. Appropriate orientation of maculae will allow peri-striolar and peripheral regions (*see* Fig. 2) of the utricle or saccule to be obtained in the same sections. The orientation of the crista is critical, as only one orientation will permit representative transversal sections as shown in Fig. 5.

5 Discussion

The two protocols detailed here yield 4-color images suitable for HC and synapse quantification using image processing programs. The first combination of antibodies and protocol has been established as optimal in our hands to quantify HCs, providing a better assessment than initial approaches such as the use of anti-calbindin and anti-calmodulin antibodies [34]. Nevertheless, other alternative antibodies can be used for this aim. Thus, the rabbit anti-tenascin antibody listed in Table 1 offers a good alternative to the anti-Caspr1 antibody to identify calyx endings and hence, HCI. Also, the goat anti-SPP1/ostepontin (Table 1) offers a good label of HCI. However, using the indicated rabbit polyclonal anti-tenascin requires colabeling with a mouse monoclonal anti-Myo7a (Table 1). Labeling with the goat polyclonal anti-SPP1/ostepontin is not compatible with the use of secondaries raised in goat. Although alternate hosts for these primary and secondary antibodies are available, the combination we suggest has been found to yield the best results. For a distinct identification of the central zone of the receptors, labeling with an anti-oncomodulin antibody (Table 1, Fig. 2) is a good approach [35].

Labeling of the calyx afferents with anti-Caspr-1 or anti-tenascin antibodies is useful to identify HCI cells, but the integrity of the calyces is also an endpoint of interest in ototoxicity studies [6, 7, 9]. For further characterization of the calyces, several choices are available, including anti-beta III tubulin (Tuj-1 clone) [7, 13], anti-KCNQ5 [6, 16], and anti-Na⁺/K⁺ ATPase alpha-3 subunit [36] antibodies.

To quantify synaptic puncta, we previously used a rabbit anti-calretinin antibody (Table 1), anti-ribeye and either anti-PSD95 or anti-GluA2 (Table 1) [6, 9]. This triple labeling protocol missed a positive label for HCIs, which were suboptimally delineated using background staining. The use of the guinea-pig anti-calretinin allows the simultaneous use of the rabbit anti-Myo7a to label all HCs. Although theoretically this protocol should still allow the use of the anti-PSD95 and the anti-GluA2 antibodies, the quadruple labeling protocol yielded poor GluA2 staining. Labeling the GluA2 subunit of the AMPA receptors is a more direct measure of the capacity for glutamatergic synaptic signaling than labeling the scaffolding protein PSD-95 of the post-synaptic density. However, loss of PSD-95 immunopuncta has been demonstrated to be a result of ototoxic damage, and therefore this endpoint is adequate for ototoxicity assessment.

Acknowledgments

This study was supported by grants RTI2018-096452-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, MCIU/AEI/FEDER, UE), and 2017 SGR 621 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya). E.A.G. was supported by the Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2014 Program) and by the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España (FPU 2014). A.B.G is a Serra-Hünter fellow. The confocal microscopy studies were performed at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). We thank Benjamín Torrejon-Escribano for advice on confocal imaging. We also thank Lara Sedó-Cabezón for her contributions to the establishment of these protocols within her PhD Thesis.

References

1. Bronstein AM (2013) Oxford textbook of vertigo and imbalance. Oxford University Press, Oxford
2. Boyes WK, Pouyatos B, Llorens J (2020) Sensory function. In: Pope CN, Liu J (eds) An introduction to interdisciplinary toxicology. Academic Press—Elsevier, London, pp 245–260
3. Michalski N, Petit C (2015) Genetics of auditory mechano-electrical transduction. *Pflugers Archiv* 467:49–72
4. Schacht J, Talaska AE, Rybak LP (2012) Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec* 295:1837–1850
5. Wilkerson BA, Artoni F, Lea C, Ritchie K, Ray CA, Bermingham-McDonogh O (2018) Effects of 3,3'-iminodipropionitrile on hair cell numbers in cristae of CBA/CaJ and C57BL/6J mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 19:483–491
6. Sedó-Cabezón L, Jedynek P, Boadas-Vaello P, Llorens J (2015) Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis Model Mech* 8:1323–1337
7. Sultemeier DR, Hoffman LF (2017) Partial aminoglycoside lesions in vestibular epithelia reveal broad sensory dysfunction associated with modest hair cell loss and afferent calyx retraction. *Front Cell Neurosci* 11:331
8. Cassel R, Bordiga P, Carcaud J, Simon F, Beranek M, Le Gall A, Benoit A, Bouet V, Philoxene B, Besnard S, Watabe I, Pericat D, Hautefort C, Assie A, Tonetto A, Dyhrfeld-Johnsen J, Llorens J, Tighilet B, Chabbert C (2019) Morphological and functional correlates of vestibular synaptic deafferentation and repair in a mouse model of acute-onset vertigo. *Dis Model Mech* 12(7):pii: dmm039115
9. Greguske EA, Carreres-Pons M, Cutillas B, Boadas-Vaello P, Llorens J (2019) Calyx junction dismantlement and synaptic uncoupling precede hair cell extrusion in the vestibular sensory epithelium during sub-chronic 3,3'-iminodipropionitrile ototoxicity in the mouse. *Arch Toxicol* 93:417–434
10. Seoane A, Demêmes D, Llorens J (2001) 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
11. Sousa AD, Andrade LR, Salles FT, Pillai AM, Buttermore ED, Bhat MA, Kachar B (2009) The septate junction protein caspr is required for structural support and retention of KCNQ4 at calyceal synapses of vestibular hair cells. *J Neurosci* 29:3103–3108
12. Moser T, Grabner CP, Schmitz F (2020) Sensory processing at ribbon synapses in the retina and the cochlea. *Physiol Rev* 100:103–144
13. Sadeghi SG, Pyott SJ, Yu Z, Glowatzki E (2014) Glutamatergic signaling at the vestibular hair cell calyx synapse. *J Neurosci* 34:14,536–14,550

14. Eatock RA, Songer JE (2011) Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annu Rev Neurosci* 34:501–534
15. Dechesne CJ, Winsky L, Kim HN, Goping G, Vu TD, Wenthold RJ, Jacobowitz DM (1991) Identification and ultrastructural localization of a calretinin-like calcium-binding protein (protein 10) in the Guinea pig and rat inner ear. *Brain Res* 560:139–148
16. 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* 31:10,101–10,114
17. Burns JC, Kelly MC, Hoa M, Morell RJ, Kelley MW (2015) Single-cell RNA-Seq resolves cellular complexity in sensory organs from the neonatal inner ear. *Nat Commun* 6:8557
18. 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* 390:1–30
19. 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 123:199–210
20. Lopez I, Honrubia V, Lee SC, Schoeman G, Beykirch K (1997) Quantification of the process of hair cell loss and recovery in the chinchilla crista ampullaris after gentamicin treatment. *Int J Dev Neurosci* 15:447–461
21. Maroto AF, Barrallo-Gimeno A, Llorens J. *BioRxiv preprint*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.423804>
22. 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* 14:661–671
23. Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol* 137:1287–1307
24. McInturff S, Burns JC, Kelley MW (2018) Characterization of spatial and temporal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle using new cell-type-specific markers. *Biol Open* 7(11):pii: bio038083
25. Desmadryl G, Dechesne CJ (1992) Calretinin immunoreactivity in chinchilla and Guinea pig vestibular end organs characterizes the calyx unit subpopulation. *Exp Brain Res* 89:105–108
26. 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* 28:857–872
27. Chen X, Levy JM, Hou A, Winters C, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Nicoll RA, Reese TS (2015) PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E6983–E6992
28. Braude JP, Vijayakumar S, Baumgarner K, Laurine R, Jones TA, Jones SM, Pyott SJ (2015) Deletion of Shank1 has minimal effects on the molecular composition and function of glutamatergic afferent postsynapses in the mouse inner ear. *Hear Res* 321:52–64
29. Sultemeier DR, Choy KR, Schweizer FE, Hoffman LF (2017) Spaceflight-induced synaptic modifications within hair cells of the mammalian utricle. *J Neurophysiol* 117:2163–2178
30. Niedzielski AS, Wenthold RJ (1995) Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci* 15:2338–2353
31. 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* 106:458–470
32. Gaboyard-Niay S, Travo C, Saleur A, Broussy A, Brugeaud A, Chabbert C (2016) Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: a rat model of vertigo symptoms. *Dis Model Mech* 9:1181–1192
33. Gove C, Walmsley M, Nijjar S, Bertwistle D, Guille M, Partington G, Bomford A, Patient R (1997) Over-expression of GATA-6 in *Xenopus* embryos blocks differentiation of heart precursors. *EMBO J* 16:355–368
34. Cunningham LL (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
35. Hoffman LF, Choy KR, Sultemeier DR, Simmons DD (2018) Oncomodulin expression reveals new insights into the cellular organization of the murine utricle striola. *J Assoc Res Otolaryngol* 19:33–51
36. Schuth O, McLean WJ, Eatock RA, Pyott SJ (2014) Distribution of Na,K-ATPase α subunits in rat vestibular sensory epithelia. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:739–754

Behavioral Assessment of Vestibular Dysfunction in Rats

**Alberto F. Maroto, Erin A. Greguske, Meritxell Deulofeu, Pere Boadas-
Vaello, and Jordi Llorens**

Experimental Neurotoxicology Methods, Chapter 9



Behavioral Assessment of Vestibular Dysfunction in Rats

Alberto F. Maroto, Erin A. Greguske, Meritxell Deulofeu,
Pere Boadas-Vaello, and Jordi Llorens

Abstract

Rodents with toxic lesions in the vestibular system display abnormalities in spontaneous and reflex behaviors that are easily recognized by knowledgeable observers. However, a quantitative assessment of the functional deficit is necessary in addition to its simple identification. In this chapter, we describe a semi-quantitative behavioral test battery that our laboratory has successfully used for almost three decades to evaluate vestibular toxicity in rats. We also describe a method recently developed for the same purpose. Using high-speed video recording, the minimum angle formed by the nose, the back of the neck, and the base of the tail during the tail-lift reflex is obtained as a fully objective and quantitative measure of vestibular function. Data collected on the same animals show high correlation values between the test battery scores and the tail-lift angles.

Key words Ototoxicity, Vestibular system, Behavioral test battery, Tail-lift reflex, Video tracking, Rat

1 Introduction

1.1 The Motor Syndrome Caused by Vestibular Dysfunction in Laboratory Animals

The vestibular system comprises several end-organs located in the inner ear. It detects gravity and accelerations generated by movements of the head [1]. The organism constantly uses vestibular information to control gaze as well as body posture and movements. Vestibular input is also necessary for cognitive functions, including among others the sense of orientation in space. Individuals are largely unaware of their vestibular sense in healthy status, but they become dramatically disabled in case of vestibular loss. Many clinically relevant vestibular pathologies are unilateral, generating an imbalance of vestibular input that most often results in vertigo. In contrast, vestibular toxicity causes a symmetric bilateral loss of function. In humans, this may not cause vertigo but disequilibrium, oscillopsia, and a defective proprioception that can generate disembodiment feelings and loss of spatial orientation.

In rodents and other species, bilateral loss of vestibular function produces a syndrome of abnormalities in motor behavior. This

syndrome was described in animals exposed to several compounds, such as 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) [2], some nitrogen mustard derivatives [3] and arsanilic acid [4] well before their vestibular toxicity was identified [5–11]. Rats and mice with vestibular deficiency caused by toxic exposure commonly show hyperactivity, stereotyped circling, backward displacement, and abnormal head movements (head bobbing). However, some variability exists among species and strains and, for instance, IDPN-induced vestibular loss results in hyperactivity in many strains of rats and mice, but not in guinea pigs [11] and 129S1/SvImJ mice [12]. This syndrome has been named the ECC (excitation with choreiform and circling movements) syndrome [13] or the waltzing syndrome [14]. The similarity of these chemically induced motor abnormalities with those shown by rodents with genetic vestibular dysfunction is now well established, so it comes to no surprise that several vestibular mutant strains have been named because for these behaviors, i.e., the waltzing rat [15], the waltzing guinea pig [16], the waltzer mouse [17], the dancer mouse [18], the shaker mouse [19], or the stargazer mouse [20], among others.

1.2 Assessing Loss of Vestibular Function in Laboratory Rodents

In comparison to other sensory systems, the vestibular system poses a greater difficulty for quantitative assessment of its dysfunction in laboratory animals. This is due to difficulties in both delivering appropriate stimuli, which are linear and angular accelerations, and recording specific and sensitive endpoints. Notwithstanding, several methods are available for this purpose, based on recording of eye movements, nervous system evoked potentials and myogenic evoked potentials (reviewed by [21]). Each of these methods has its strengths and weaknesses to evaluate one particular aspect of vestibular function. However, their technical complexity and their requirements of labor time make them suboptimal for addressing the most common problems in toxicity assessment: the easy and quick identification of agents with potential toxicity on the system, and the obtention of dose–response and time-course data of functional loss following the toxic exposure. While the behavioral syndrome caused by vestibular loss in rodents is dramatically apparent, clear criteria for its recognition are necessary and methods to quantify the loss are required. For almost three decades, our laboratory has been using a behavioral test battery to assess vestibular toxicity. This battery [9], slightly modified from the initial design [8], uses subjective assessment to obtain a semi-quantitative rating score that has been well documented [10, 11, 22]. Its rationale and implementation will be described in this chapter. While using this test battery, we noticed a particularly robust consistency for one of its items, the tail-lift reflex (see [23]). Recently, we have developed a method to obtain quantitative and objective data from this reflex and obtained good evidence of its promising interest [24, 25]. This chapter will therefore include a detailed description of the assessment of the tail-lift reflex.

2 Behavioral Test Battery for the Semi-Quantitative Assessment of Vestibular Loss in Rodents

2.1 *Rationale and Overall Description*

Initially, our test battery was inspired by that designed to evaluate the effects of IDPN on spontaneous motor behavior [26, 27]. These authors evaluated the IDPN-induced motor syndrome without recognition of its vestibular basis, which was discovered later [8]. The battery includes six items (Fig. 1), of which three are spontaneous behaviors and three are anti-gravity reflexes, as vestibular dysfunction results in abnormalities in both spontaneous and reflex activity. The observed spontaneous behaviors are: (1) circling, (2) backward walking, and (3) head bobbing; the items assessing reflex activity are: (4) the tail-lift reflex, (5) the contact-inhibition of the righting reflex, and (6) the air-righting reflex.

Stereotyped circling activity is the most obvious result of vestibular deficiency in rats and mice, as shown in several internet videos that can be found by searching “waltzing mouse.” This can take the form of ample circles, of about 50 cm of diameter in rats, or smaller circles, as small as allowed by the animal’s size, well described as “tail-chasing” activity (Fig. 1a). This can last for tens of seconds with an apparent difficulty of the animal to stop, and usually, but not always, associates with hyperactivity. Indeed, circling is also observed in vestibular-deficient rats and mice that do not show an increased level of activity [12]. While vestibular deficiency causes circling, circling activity alone can have other causes, such as an imbalance in dopamine systems sources [28].

Another consequence of vestibular deficiency is backward displacement or walking (Fig. 1b). This is more often seen in the initial days after the ototoxic treatment and tends to disappear or become less frequent at longer times. It usually presents as bursts of backward displacements that last a few seconds until the animal encounters a wall or obstacle. In some cases, the movement is quite coordinated on the four paws, but is more often caused by pedaling with the forepaws, as if animals were trying to stop slipping downhill.

The third item in the test battery is the abnormal head movements (Fig. 1c). Vestibular-deficient rats show exaggerated repetitive movements of the head or bobbing. These can be side to side (“no”), but more frequent are nodding (“yes”) movements or backward hyperextension of the neck. The bobbing behavior has been used as a single measure to quantify the vestibulotoxic effect of several nitriles [29, 30]. When circling fast, vestibular-deficient rats do not show bobbing, but this movement may appear at the end of circling bursts or together with slower circling or non-circling ambulation. The bobbing and even more the backward hyperextension of the neck may combine with backward walking. Quite frequently, the rat stays for several seconds with

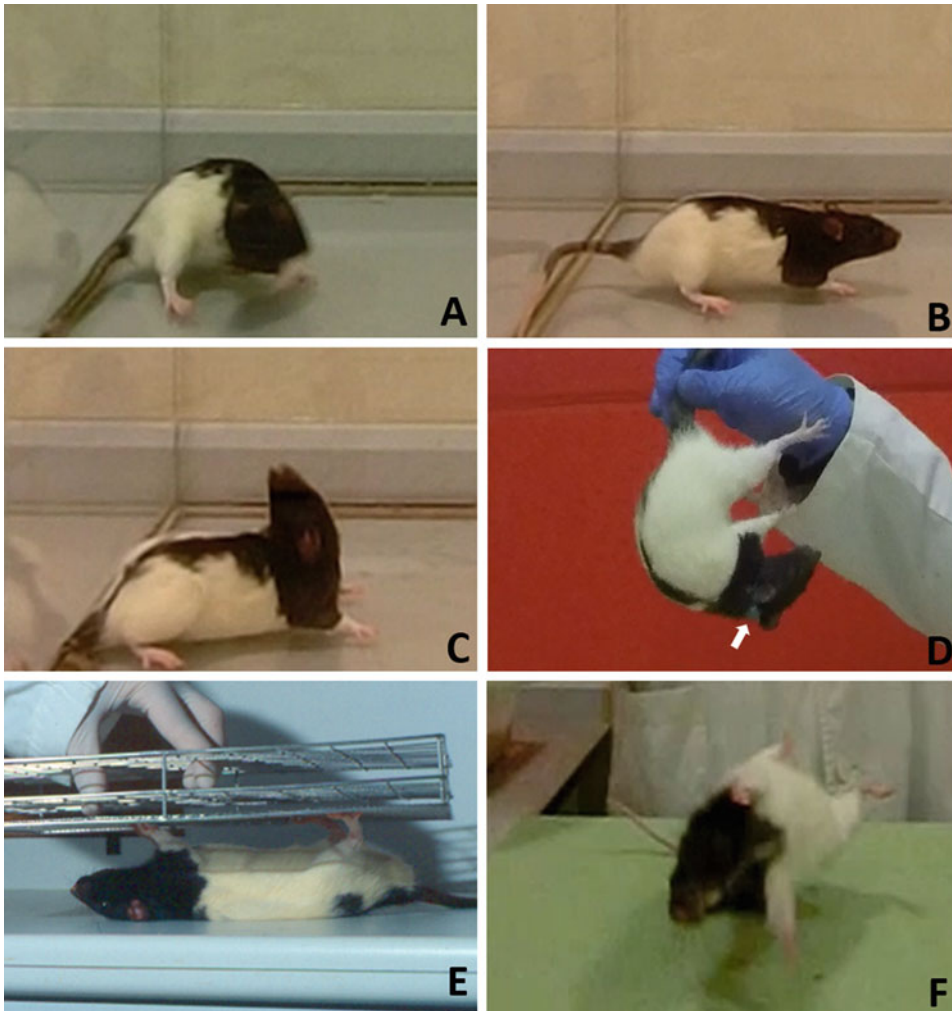


Fig. 1 Pictures illustrating the six items included in the behavioral test battery to obtain vestibular dysfunction ratings. **(a)** Circling. The position of this rat denotes a spinning activity, with a circle as small as allowed by the maximal possible lateral flexion of the body. **(b)** Backward walking. Note the ataxic opening of the hindlimbs. In this posture, the vestibular-deficient rat may push the floor with the hind and fore paws generating a backward displacement. **(c)** Characteristic hyperextension of the neck (star-gaze), usually alternating with repetitive bobbing movements. **(d)** Tail-lift reflex in a rat with vestibular deficiency. The arrow points to the marble used for the analysis of this reflex by high-speed video recording. **(e)** Contact-inhibition of the righting reflex in a vestibular-deficient rat. Rats with intact vestibular function immediately right when placed supine on the bench. **(f)** Back landing due to a defective air-righting reflex

the neck in exaggerated hyperextension, a behavior that has generated the name of a mutant strain of mice, the stargazer mouse [20].

The three reflexes included in the battery are anti-gravity reflexes. The first one is the tail-lift reflex [6]. A healthy rat submitted to a tail-lift maneuver shows an extension reflex of the trunk and paws, allowing it to land on its forepaws first, followed by the hind

paws, when lowered down. This landing reflex makes evident the tonic anti-gravity input that the vestibular system exerts on the spinal motor nuclei to control body posture [31, 32]. When the vestibular input is absent, the rat bends ventrally and tends to occipital or back landing (Fig. 1d) [6, 24, 33]. A remarkable observation is that the bending response shows a gradation, from just an incomplete extension response in slightly deficient rats to a total flexion of the body, in which the forepaws or the nose touch the experimenter's hand grasping the tail, in rats suffering a deep vestibular deficiency [24]. The second reflex examined is the righting reflex of the rat placed supine between two surfaces [7, 34]. The aim of the test is to evaluate the loss of perception of the direction of gravity. Healthy rats quickly right themselves without hesitation. Rats with absent vestibular function will stay in supine position, frequently walking and circling (Fig. 1e). In the absence of vestibular function, touch becomes the main sensory input signaling body orientation, and the presence of a surface contacting the paws suffices to inhibit the righting response. In the absence of this surface, or if it is removed when the rat stays supine, the rat will quickly right to the prone position. The same inhibition by contact of the righting reflex is observed in vestibular-deficient mice and guinea pigs, while no contact is necessary for the absence of righting in frogs [11]. The third anti-gravity reflex included in the test battery is the well-known air-righting reflex test [7], in which the rat is dropped in supine position to fall on a foam cushion (Fig. 1e). Healthy rats right themselves while in the air to land on their paws, while vestibular-deficient animals fail to right.

A widely accepted test of vestibular dysfunction not included in the present battery is swimming (e.g., [35]). Vestibular-deficient rodents are unable to swim and show barrel rolling when placed in water, so they need to be immediately rescued to avoid drowning. A swimming test was included in our first version of the battery [8], but eliminated later [9]. This was due to the evidence that the swimming test did not add significant value to the battery while being quite stressful for healthy animals and very stressful for the vestibular-deficient ones.

2.2 Detailed Protocol for Rats (See Note 1)

Rats are first observed for 1 min for the abnormalities in spontaneous behavior in an adequate arena. We have used either a 100 × 100 × 50 cm white wood open field or a 50 × 50 × 40 cm glass cube placed on a bench. As in any observational measure of behavior, the experimenter must stay quiet or use a remote video system for observation. The reflex tests are then delivered, beginning with the tail-lift, followed by the contact-righting, and finally testing the air-righting reflex. This sequence goes from less to more stressing manipulations. Each reflex is examined once but can be repeated a second or even a third time if needed to decide a rating. To generate the tail-lift reflex, the rat is

grasped by the base of the tail and quickly but gently lifted about 30–40 cm, then lowered down. The animal must be lifted and immediately descended, not held in the air (*see Note 2*), so the maneuver is completed in less than a second. To evaluate the contact-righting response, the rat is grasped by the body, then quickly turned to the supine position, and placed on its back on a bench while a metal bar grid (we use a spare shelf from a fridge) is simultaneously placed on its paws. This grid must be held in contact with the paws, at a distance from the bench that allow the rat to be in a posture like its natural walking position, with the extremities in semiflexion. For the air-righting reflex, the experimenter cups the rat's body in supine position with the two hands at about 40 cm above a foam cushion and suddenly releases it to fall on the cushion (*see Note 3*).

Each of the six items in the battery are rated 0–4, and the values are then added to obtain a Vestibular Dysfunction Rating (VDR) with a maximum of 24 [9, 10]. The values are given according to the descriptions in Table 1, which respond to the following overall criteria: 0, normal behavior or response, as seen in healthy rats before any toxic treatment; 1, not sure if the behavior or response is normal or not; 2, slightly but undoubtedly abnormal behavior or response; 3, moderately abnormal behavior or response; and 4, extremely abnormal behavior or response (*see Note 4*).

2.3 Consistency of the Test Battery

In repeated testing, the test battery shows a remarkable stability in its measure of irreversible vestibular damage [8–10, 24] and a capacity to detect functional recovery in case of reversible damage, as occurs in the case of chronic IDPN exposure [24, 36]. Nevertheless, not all items show the same stability. With time, backward walking tends to become less frequent, while circling is more persistent (*see Note 5*). Also, some degree of learning seems to affect the contact-righting reflex, as some control rats may show a less immediate response when tested repeatedly. By contrast, the tail-lift reflex shows a remarkable stability.

In dose–response studies comparing with histological assessment, the test battery has proved to be quite sensitive, so only undamaged animals and animals with only small lesions located in the apical crista show baseline levels (VDRs in the 0–3 range) [8, 10, 23, 24].

After proper training, variability across experimenters in our laboratory is low. However, we have not carried out a systematic evaluation of this variability. Also, no data has been gathered to evaluate cross-laboratory variability.

2.4 Adaptation of the Vestibular Test Battery for Mice

The behavioral syndrome induced by vestibular toxicity in the mouse [1, 29, 30] is identical to that observed in the rat, so the same test battery has been successfully used in this species after minor adaptation [11, 22, 37]. We use a standard Macrolon cage

Table 1
Scores used to obtain Vestibular Dysfunction Ratings (VDRs) in the Behavioral Test Battery

Score Item	0 (Normal)	1 (Dubious)	2 (Mild)	3 (Overt)	4 (Extreme)
Circling	The rat ambulates normally and does not display stereotyped circling	The experimenter is unsure of whether the rat is moving in circles more than normal	The rat shows an unmistakable tendency to move in circles	The rat spends a long time moving in wide circles or shows bursts of rapid circling in a small area (tail-chasing behavior)	The rat spends most of the time moving in circles or displays prolonged bursts of fast tail-chasing activity; being apparently unable to stop circling
Backward walking	The rat ambulates normally and does not display backward displacement	The experimenter is unsure of whether the rat has a tendency to push to its back when not walking or immediately after being placed in the observational arena	The rat shows one or two short (up to one body length) backward displacements	The rat makes several (3 or more) and long (more than its body length) displacements backward	The rat frequently moves backward or keeps pushing backward against the wall of the open field after reaching it. The hind limbs may move up the wall until the rat falls on its side
Head bobbing	The rat ambulates normally and does not display abnormal head movements	The experimenter is unsure whether the movement of the head is normal or not	The rat displays mild but overtly abnormal nodding movements of its head	The rat does wide and quite frequent nodding movements, sometimes up to extreme hyperextension of the neck (stargazer behavior)	The rat displays very frequent wide nodding activity and frequently stays for several seconds in extreme hyperextension of the neck
Tail-lift reflex	The rat extends the fore and hind limbs and the trunk in a coordinated landing response	The experimenter is unsure whether the rat is showing an incomplete extension	The rat shows a mild ventral flexion, with a minimum angle that would cause nose or face landing	The rat shows an ample ventral flexion, with a minimum angle that would cause neck landing	The rat completely curls the body, reaching a posture that may cause landing on the middle to caudal part of its back

(continued)

Table 1
(continued)

	0 (Normal)	1 (Dubious)	2 (Mild)	3 (Overt)	4 (Extreme)
Contact-inhibition of the righting reflex	The rat immediately rights itself between the bench and the grid	The experimenter is unsure whether the rat hesitates before righting	The rat spends a noticeable time in supine position before righting	The rat stays in supine position for a long time (more than 10 s) and then rights hesitantly	The rat stays in supine position as long as the grid is maintained in contact with its paws. It usually walks and circles in this upside-down position. If the grid is lifted slowly, it grasps it to keep the contact
Air-righting reflex	The rat immediately rights itself in the air, and lands symmetrically with the four paws	The experimenter is unsure that the rat has landed symmetrically	The rat has incompletely righted when landing, the landing denotes disequilibrium	The rat shows an overtly defective righting response and lands on its side or back	The rat shown no righting response, it falls on the cushion in the same supine position it had when released

for rat housing ($215 \times 465 \times 145$ mm) as open field for the observation of spontaneous behavior. The correct evaluation of the spontaneous behavior requires adequate avoidance of any stress. Other differences between the rat and the mouse protocols are related to the righting reflexes. When testing the contact-inhibition of the righting reflex, it is important that a flat surface, such a A4-size plastic board, is used, not a grid. Placing the mouse in supine position on the bench and below the board becomes somehow tricky and requires some practice. To test the air-righting reflex, we use the following maneuver: the mouse is placed facing the experimenter with its paws on a small plastic board; the animal is then pulled by the base of the tail away and into the air with a rotating gesture, so it attains a supine position in the air and the experimenter releases the animal at 10–20 cm above a foam cushion.

3 The Tail-Lift Test for Rats

3.1 Rationale

As explained above, we observed that the tail-lift reflex was particularly robust as a measure of the degree of vestibular dysfunction. Thus, we observed that small but consistent changes in the tail-lift reflex were an early effect of vestibular toxicity and increasing degrees of vestibular damage caused an increase in the abnormal ventral flexion of the trunk. This led us to the hypothesis that the angle formed between the nose, the back of the neck, and the base of the tail (Fig. 2) could provide an objective measure of the degree of vestibular dysfunction. We therefore developed a protocol to

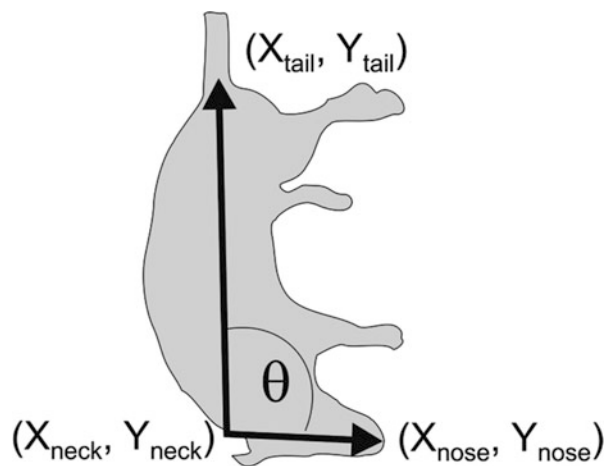


Fig. 2 Geometric interpretation of the neck-to-tail vector and neck-to-nose vector defining the tail-lift angle. The analysis of the video movies provides the three pairs of X and Y coordinates at a frequency of 240/s

obtain a good measure of this angle and evaluated its ability to assess irreversible and reversible vestibular dysfunction [24]. This method, described in more detail here, was found to offer a good measure of vestibular dysfunction.

3.2 Objective Measure of the Tail-Lift Reflex in Rats

Materials.

- Standard rat cage, without lid.
- Background for recording offering high contrast with the rats. For our hooded Long-Evans rats, we taped a red board on the wall.
- Small rubber bands with a white, blue, or green marble, to be used as collars on the neck of the rat. These colors offer good contrast with the brown fur of the rat and the red board on the back wall.
- Video camera capable of high-speed (240 frames per second) recording (*see Note 6*). We have used two different cameras, a Casio Exilim ZR700 and a GoPro 5.
- Small tripod to hold the camera.
- Video tracking software. We use the free software Kinovea (www.kinovea.org).
- Data analysis software. We use the free software environment R-Studio.

Method for video recording.

- Place the rat cage on the bench, with its long axis parallel to the high contrast background.
- Place the video camera on the tripod, oriented perpendicular to the cage and background. The movie must cover the entire up and down trajectory of the points to be used (nose, back of the neck, base of the tail) when above the cage limit (*see Note 7*).
- Place the rubber collar around the neck of the rat, with the marble on the back (Fig. 1d) (*see Note 8*).
- Place the rat on the cage, turn on the video recording at 240 fps, and proceed with the tail-lift maneuver as described above (*see Notes 9 and 10*). The movie must show the rat from its profile for a continuous view of the nose, the marble on the back of the neck, and the beginning of the tail.
- Remove the collar with the marble and get the rat back to its home cage.

Method for video analysis using Kinovea.

- Open Kinovea and select the movie to be analyzed.
- In the Motion menu, select “High speed camera” and enter the recording speed (240 fps).

- To calibrate pixels to physical lengths, select the line tool from the drawing tool bar and draw a line over a desired segment of known length. A right click on the line will open the menu to calibrate the measure, where to add the real length of the segment. Next, delete the line to not disturb the video analysis; the calibration remains as determined.
- In the Image menu, select “Coordinates system origin” to locate the origin of the axis that will be used to define point coordinates. Select a desired location to place the coordinate system. We use a corner of the cage as a standard point of origin.
- In the options menu, time marker formats can be selected. We use total milliseconds.
- To track the points of interest, select a cross-marker from the drawing tool bar and place three of them on the nose, neck (marble), and base of the tail, in this order (*see Note 11*). Then right click on the cross-marker and select Track path (*see Note 12*). Move the video forward by using the Play button. Alternatively, use the Next Frame button, or the Mouse Wheel for a frame by frame tracking. Check that tracking is correct and adjust if necessary (*see Note 13*). If desired, display options can be selected to change the drawing of the path.
- To finish tracking, right click and select End Path Edition.
- Examine the tracking paths and make further corrections if necessary (*see Note 14*).
- Save the video including only the frames of interest by selecting Start and End of a Working Zone. The video can be saved with the tracking data in the file, which will be suitable to be opened in Kinovea for further analysis or re-analysis. Alternatively, the video can be saved with permanent paint of the image data, generating a file that can be viewed using standard video players.
- From the main menu, export the path data by selecting File > Export to Spreadsheet > Trajectories to simple text.
- If a second rat is included in the same video, the tracked path of the first rat must be deleted after the data have been saved and before starting the new tracking.
- Open the exported data file and check coherence of the data, meaning that all setups were correctly adjusted, the file contains data from only one rat, and the tracking has been adequate (*see Notes 15 and 16*). There are three columns, showing left to right: time in milliseconds, X position, and Y position. Data for each marker are placed one below another, in order: nose, neck, and tail.

Method for analysis of the coordinates data (see Note 17).

- Use the XY coordinates of the nose, back of the neck (marble), and base of the tail to calculate the angle formed by these three

points at each time point. The coordinates define two vectors “a” (neck to tail) and “b” (neck to nose) that define the angle θ (Fig. 2). The dot product of the two vectors is defined by: $a \cdot b = |a||b|\cos\theta$, from which the angle can be obtained. Convert resulting radians into degrees.

- Obtain the minimum angle from the tail-lift angle series of each reflex.

4 Notes

1. This test battery does not usually require habituation, at least in young adult Long-Evans rats. We routinely evaluate the animals a few days before the exposure to the ototoxic treatment to obtain pre-test data. During these pre-test sessions, the animals have occasionally shown behaviors interfered by an excessive reactivity to manipulation, as movements driven against the hand grasping the tail during the tail-lift maneuver. In these cases, we have habituated the animals with a second pre-test session.
2. Grasping the tail near its base, not at the middle or tip segments is important to avoid hurting or stressing the rat, and to elicit the desired reflex. The up and down movement must be continuous and smooth. Adequate execution of the maneuver is made evident by the behavior of healthy rats. If not properly performed, the rat will show active responses, such as turning the body to one side and attempts to oppose the manipulation. The desired control response is that in which the rat behavior is only directed to smooth landing. Active (undesired) responses are more frequent the first time of testing, but quickly disappear with repeated testing.
3. For the air-righting reflex, the rat must be held firmly but gently, to decrease as much as possible its stress but limiting its freedom to move. The experimenter must take care in holding all animals similarly and at the same height. The release of the rat must be fast and must avoid giving it any acceleration. If the grip is decreased too slowly, the rat starts righting while in the hands of the experimenter and then gets a rotatory force when the experimenter moves them away.
4. The use of a 0–4 range of scores provides robustness to the ratings. For any observation, the experimenter may doubt between one of two scores (for instance, between 3 and 4), but not a third one (your choice will not be 2 if you doubt between 3 and 4). Therefore, choosing one or the other of the two possible ratings will have a small impact on the global result, so when all items for each animals are pooled, differences among groups (for instance, dose groups) become robust.

5. The spontaneous behaviors are partly competing and a decrease in the frequency or intensity of backward walking or bobbing frequently associates with increased circling, so on repeated testing the composite score tends to be more stable than each individual item.
6. High-speed video recording is available in many domestic cameras and smartphones. The 240-fps speed is eight times the speed of standard video recording (30 fps) and provides enough precision to assess the tail-lift angle.
7. The optimal location will vary with different cameras and tripods, but their placement respect to the cage must be constant. We have it marked on the bench.
8. The diameter of the rubber collars must be adequate. If too loose, they will not hold the marble in the desired position. If too tight, they cause discomfort and the rats remove them.
9. The main difficulty is to obtain a movie that provides a constant profile image of the rat, with a continuous view of the three reference points, as this view is lost if the animal twists the body to one side. This may be caused by a deficient performance of the experimenter, but this problem is greatly reduced by practice. More often, the rat may twist its trunk as a reaction against the passive lift, causing both interference with the vestibulo-motor reflex and impairment to the quality of the movie. To avoid this interference of the tail-lift reflex with spontaneous motor behavior, the rat must be unstressed. We obtain better results laying some wood shavings on the cage, and simultaneously placing on it the 2–4 rats that are housed together. We then record these animals one after the other in the same movie. We display a handmade sign to identify rats as we record them for individual assessment.
10. The movie must contain a reference for distance calibration. We use the dimensions of a post-it label that we stick on the cage with the number of the group of rats being recorded.
11. Changing the order of the points will change the order of the data in the output file.
12. Kinovea can provide angles as output. However, our protocol obtains the raw coordinates of the three points and then calculates the angles from these coordinates. The coordinates can be used for other analyses in addition of the angle analysis.
13. Tracking in Kinovea is a semi-automatic process. Point locations are automatically computed, but they can be adjusted if needed. During tracking, misplaced points can be adjusted to the correct positions dragging the outer rectangle until its center cross-matches the correct location.

14. After tracking, a path can be edited again by going back to the previous frame, right clicking on it, and selecting Restart Path Edition.
15. The whole movement should be around 400–800 ms. If it shows oddly great numbers, like 1000–8000 ms, make sure that you have adjusted the time display to 240 fps.
16. Check that each of the three markers has been tracked the same amount of time, so the three lists of coordinates have the same length. Unequal series will generate an error when processing the data files.
17. A script in R programming to perform this data analysis has been published as supplementary material for the article Martins-Lopes et al. (2019) [24].

5 Results and Discussion

Figure 3 shows raw results from the tail-lift test from one of our experiments using young (2–4 months) adult male Long-Evans rats. Healthy (control) rats show tail-lift angles in the 130–170° range, while vestibular-deficient rats show reduced angles as the extension landing reflex is substituted by ventral curling. Together, the data collected in two different experiments [24] indicated that this method offers an objective and fully quantitative assessment of vestibular dysfunction. The minimum angle during the tail-lift maneuver was found to better correlate with the vestibular lesion than other measures of the reflex, such as the average angle during a frame of time around its peak.

One notable observation was that of the high correlation found between the tail-lift angle and the VDR values obtained with the behavioral test battery in the same rats [24]. We concluded that both measures provide a similar assessment of vestibular function. This validates the behavioral test battery with data from a fully objective and quantitative method. Both methods have minimal needs of equipment and expertise, making them suitable for easy implementation in many laboratories. Importantly, recent data [25] from our laboratory indicates that the tail-lift angle measured in rats, after completion of the ototoxic damage, mostly associates with the loss of type I hair cells, one of the two types of sensory cells in the vestibular epithelium. These cells are consistently more susceptible to toxic damage than the other type of vestibular sensory cells (named type II), so the evaluation of the tail-lift reflex has an undoubtable interest in vestibular toxicity assessment.

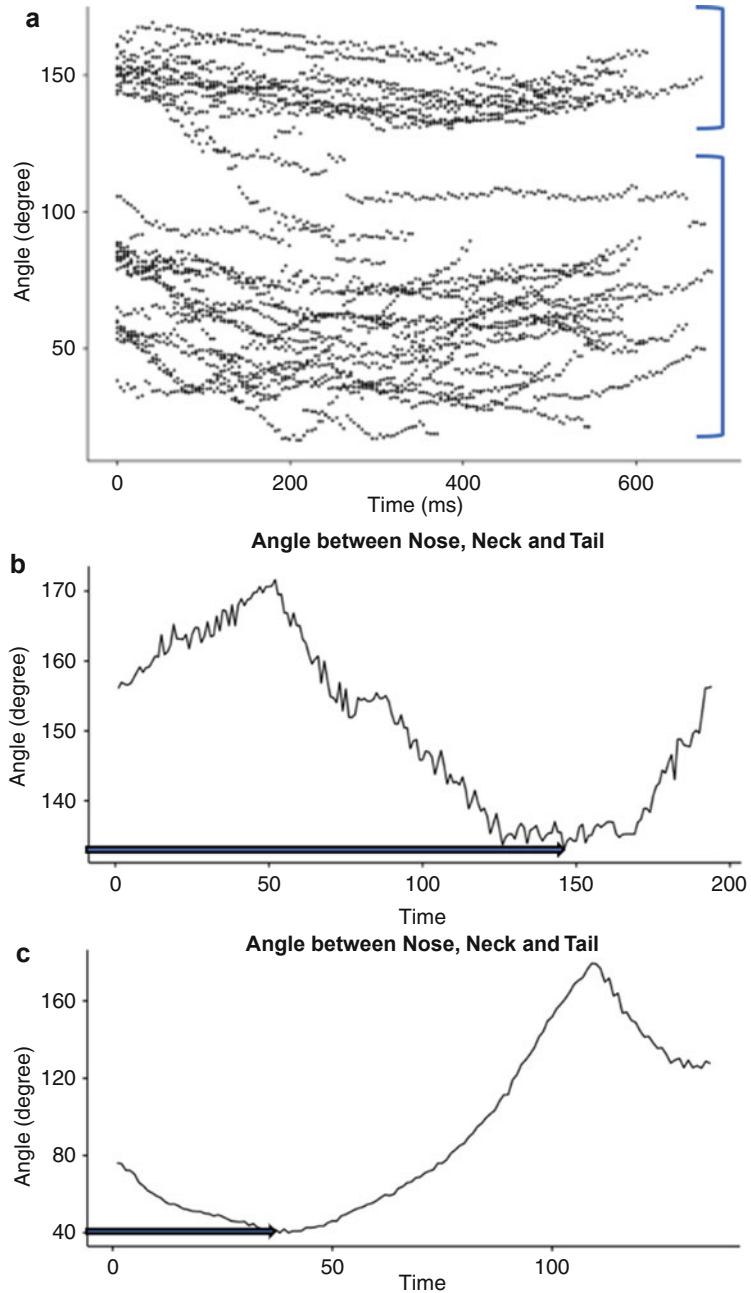


Fig. 3 Raw data of angle vs time. (a) All points from rats in two groups, control (upper bracket) and vestibular deficient (lower bracket) are shown with no connecting lines. The existence of two groups with different behaviors is evident. (b) Representative record from a control rat, with the data points connected by a line, displaying a minimum angle of about 130°. (c) In this representative record from a vestibular-deficient rat, the minimum angle is near 40°. Note the difference in scale between graphs in b and c

Acknowledgments

This study was supported by grants RTI2018-096452-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, MCIU/AEI/FEDER, UE), and 2017 SGR 621 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya). We thank former undergraduate and master students of the laboratory Sílvia Prades, Adrià Ricarte, Anna Bellmunt, and Vanessa Martins-Lopes for their contributions to the development of the tail-lift test.

References

- Bronstein AM (2013) Oxford textbook of vertigo and imbalance. Oxford University Press, Oxford
- Delay J, Pichot P, Thuillier J, Marquiset JP (1952) Action de l'amino-dipropionitrile sur le comportement moteur de la souris blanche. *C R Sot Biol* 146:533–534
- Goldin A, Noe HA, Landing BH, Shapiro DM, Goldberg B (1948) A neurological syndrome induced by administration of some chlorinated tertiary amines. *J Pharmacol Exp Therap* 94:249–261
- Oliver WT, Roe CK (1957) Arsanilic acid poisoning in swine. *J Am Vet Med Assoc* 130:177–178
- Anniko M, Wersall J (1977) Experimentally (atoxyl) induced ampullar degeneration and damage to maculae-utriculi. *Acta Otolaryngol* 83:429–440
- Hunt MA, Miller SW, Nielson HC, Horn KM (1987) Intratympanic injections of sodium arsanilate (atoxil) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav Neurosci* 101:427–428
- Ossenkopp KP, Prkacin A, Hargreaves EL (1990) Sodium arsanilate-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacol Biochem Behav* 36:875–881
- 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 123:199–210
- Llorens J, Rodríguez-Farré E (1997) Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 19:117–127
- 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
- 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
- Boadas-Vaello P, Sedó-Cabezón L, Verdú E, Llorens J (2017) Strain and sex differences in the vestibular and systemic toxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in mice. *Toxicol Sci* 156:109–122
- Selye H (1957) Lathyrism. *Rev Can Biol* 16:1–82
- Thuillier J, Burger A, Mouille P (1953) Contribution to the study of a motor syndrome induced in mice by amino-dipropionitrile (waltzing mice). *C R Seances Soc Biol Fil* 47:1052–1055
- Rabbath G, Necchi D, de Waele C, Gasc JP, Josset P, Vidal PP (2001) Abnormal vestibular control of gaze and posture in a strain of a waltzing rat. *Exp Brain Res* 136:211–223
- Sobin A, Anniko M (1986) Otoconial pathology in a strain of the waltzing Guinea pig. *Am J Otol* 7:449–453
- Demêmes D, Sans A (1985) Pathological changes during the development of the vestibular sensory and ganglion-cells of the bronx waltzer mouse—scanning and transmission electron-microscopy. *Dev Brain Res* 18:285–295
- Wennngren BI, Anniko M (1989) Vestibular hair cell pathology in the dancer mouse mutant. *Acta Otolaryngol* 107:182–190
- Anniko M, Sobin A, Wersäll J (1980) Vestibular hair cell pathology in the Shaker-2 mouse. *Arch Otorhinolaryngol* 226:45–50

20. 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
21. Llorens J, Callejo A, Greguske EA, Maroto AF, Cutillas B, Martins-Lopes V (2018) Physiological assesment of vestibular function and toxicity in humans and animals. *Neurotoxicology* 66:204–212
22. 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* 14:661–671
23. Balbuena E, Llorens J (2001) Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res* 904:298–306
24. Martins-Lopes V, Bellmunt A, Greguske EA, Maroto AF, Boadas-Vaello P, Llorens J (2019) Quantitative assessment of anti-gravity reflexes to evaluate vestibular dysfunction in rats. *J Assoc Res Otolaryngol* 20:553–563
25. Maroto AF, Barrallo-Gimeno A, Llorens J. *BioRxiv preprint*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.423804>
26. Diamond BI, Reyes MG, Borison R (1982) A new animal model for Tourette syndrome. *Adv Neurol* 35:221–225
27. Crofton KM, Knight T (1991) Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 13:575–581
28. Willis GL, Kennedy GA (2004) The implementation of acute versus chronic animal models for treatment discovery in Parkinson's disease. *Rev Neurosci* 15:75–87
29. Tanii H, Hayashi M, Hashimoto K (1989) Nitrile-induced behavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology* 10:157–166
30. Tanii H, Kurosaka Y, Hayashi M, Hashimoto K (1989) Allylnitrile: a compound which induces long-term dyskinesia in mice following a single administration. *Exp Neurol* 103:64–67
31. Wilson VJ, Yoshida M (1968) Vestibulospinal and reticulospinal effects on hindlimb, forelimb, and neck alpha motoneurons of the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60:836–840
32. Basaldella E, Takeoka A, Sigrist M, Arber S (2015) Multisensory signaling shapes vestibulo-motor circuit specificity. *Cell* 163:301–312
33. Pellis SM, Pellis VC, Teitelbaum P (1991) Labyrinthine and other supraspinal inhibitory controls over head-and-body ventroflexion. *Behav Brain Res* 46:99–102
34. Shoham S, Chen Y-C, Devietti TL, Teitelbaum P (1989) Deafferentation of the vestibular organ: effects on atropine-resistant EEG in rats. *Psychobiology* 17:307–314
35. Pau H, Hawker K, Fuchs H, De Angelis MH, Steel KP (2004) Characterization of a new mouse mutant, flouncer, with a balance defect and inner ear malformation. *Otol Neurotol* 25:707–713
36. Sedó-Cabezón L, Jedynek P, Boadas-Vaello P, Llorens J (2015) Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis Model Mech* 8:1323–1337
37. Boadas-Vaello P, Jover E, Saldaña-Ruíz 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

