



Neurotoxicitat i metabolisme de nitrils a la rata i el ratolí

Tesi doctoral presentada per

Pere Boadas i Vaello

L'Hospitalet de Llobregat, 2008



Memòria presentada per **Pere Boadas i Vaello**, llicenciat en Bioquímica, per a optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona.

Programa de doctorat de Biomedicina. Bienni 2004-2006.
Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina.
Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Jordi Llorens i Baucells, a la Unitat de Fisiologia del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona (Campus Bellvitge).

El director de la tesi,

L'interessat

Jordi Llorens i Baucells

Professor Titular

Dept. Ciències Fisiològiques II

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Pere Boadas i Vaello

L'Hospitalet de Llobregat, 2008

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

Projecte BFI2003-01606 «Neurotoxicidad y metabolismo de nitrilos sintéticos y naturales», del “Ministerio de Ciencia y Tecnología”

Projecte BFU2006-00343/BFI «Nuevos modelos de axonopatía neurofilamentosa por nitrilos en rata y ratón», del “Ministerio de Ciencia y Tecnología”

Morir és traslladar-se a una casa més bella. «Es tracta, senzillament, d'abandonar el cos físic tal com la papallona abandona el capoll de seda quan està llesta per volar».

Elisabeth Kübler-Ross



*A la meva mare,
que havent emprès el vol, gaudeixi d'un bon viatge*

*Al meu pare,
un model a seguir*

*A la Gemma,
gràcies a ella un i un sumen tantíssim*

El meu gargot, el meu camí

Fa poc més de quatre anys em vaig calçar les botes i vaig començar un camí de trajecte desconegut. Semblava un camí normal, com qualsevol altre GR dels Pirineus, però ben aviat vaig comprovar que no ho era tant. El camí el formaven dos corriols, un portava el nom de "ciència" i l'altre el de "vida" i no sempre anaven paral·lels. De fet, en certes ocasions es separaven tant que es feia difícil imaginar que tornarien a ajuntar-se.

Azui, havent arribat dalt d'un nou pic, m'assec a descansar i mirant cap enrere segueixo el traçat dels dos corriols, que passant per prats, muntanyes, refugis, rius i valls de tota mena, s'han anat entrecreuant i separant talment com si es tractés del gargot d'un nen petit, per acabar tots dos, provisionalment, dalt d'aquest cim espectacular.

Al llarg d'aquest camí, he pogut viure moltes experiències. Algunes han estat fantàstiques i d'altres més aviat tot el contrari, però en definitiva, el fet d'haver-les pogut compartir amb tota la gent que m'ha volgut acompanyar, fa que avui, enlloc de sentir-me cansat i estressat, em senti afortunat i ple d'energia per a continuar.

Així doncs, mirant de nou cap enrere i sense voler oblidar-me de ningú, voldria agrair el suport rebut a tots els companys de camí:

- A en **Jordi**. Amb ell he pogut gaudir de la ciència en estat pur. He pogut viure-la com a mi m'agrada, pensant que tot el que feia, per lluny que estiguéssim de l'objectiu final, tard o d'hora repercutiria en una part de la societat que pràcticament està oblidada. Si amb aquesta tesi s'ha pogut fer un nou pas, per petit que sigui, n'estaré molt satisfet.

- A tots els que han anat passat pel laboratori: l'Eduard, la Diana, l'Àlicia, la Sandra i molt especialment a la Judith, a la Núria i a la Carla. Amb la **Judith** vam compartir la pitjor etapa del meu camí però gràcies a ella la feina del laboratori es feia menys feixuga i fins i tot, malgrat les circumstàncies, ens ho acabàvem passant genial. Amb la **Núria** vam compartir menys hores al laboratori, però suficients per recordar que m'hagués agradat molt continuar treballant amb ella, perquè entre ratolí i ratolí, les hores passaven volant i això no passa amb qualsevol. Amb la **Carla** hem compartit una etapa més planera i que aviat arribarà al seu final. Encara no sé on acabaré treballant, però sí que sé que m'agradaria tenir un company de feina amb qui pogués tenir tanta complicitat com amb la Carla. Honestament crec que som un gran equip!

- A l'**Arnau**, l'**Eduard**, en **Pol** i la resta de companys i amics del departament amb qui tantes xerrades, dinars i cafès hem pogut compartir. En tot camí cal buscar un bon refugi on acampar i ells ho han estat en moltes ocasions. El camí sense ells no hagués estat el mateix.

- A **Julia**. Nunca hubiera pensado tener en Bellvitge y lejos de casa las conversaciones más adecuadas y en el momento más oportuno sin ni siquiera haberlas buscado. ¿Casualidad? No, las casualidades no existen, ¿verdad Julia? Julia me ha ayudado a descubrir un mundo que desconocía y que me ha ayudado mucho más de lo que yo hubiese imaginado en un principio. También intentó que “descargase mi mochila” porque el camino iba cuesta arriba y, aunque descargarla de todo lo innecesario fue difícil, sí que aprendí, como buen caminante, que el buen equipaje debe estar libre de “sobrepeso”.

- A tots els del laboratori del CSIC. Especialment a en **Josep Maria** per haver-me acollit al seu laboratori, i a l'**Eric**, per haver-me permès aprendre tantes coses

d'una disciplina tan distant de la meua. Però sobretot, perquè juntament amb els del seu laboratori m'ho vaig passar de conya!

- A tot el personal de l'estabulari, que des dels temps de la **Pilar** tantes hores hem passat junts entre rates i ratolins. I per cert, d'alguna manera a aquests últims també se'ls ha d'agrair la seua disponibilitat, que tot i que ningú els ho ha demanat, el servei que fan els animals de l'estabulari per avançar en el coneixement de les malalties dels humans és increïble.

- A tota la resta d'amics que m'han acompanyat, sobretot als **SASA**, als **eibiobio** i als **BRASOLers**. Són moltes les vivències que junts hem pogut compartir i moltes d'elles han transcorregut paral·lelament a aquest camí de tesi. Com deia abans, tots ells també han estat grans refugis i companys de camí i, si ja és prou fantàstic tenir molts amics, encara ho és més veure que quan més els necessites no es mouen del teu costat.

- A la tota la família de la Gemma. Especialment a la **M. Teresa** i en **Joaquim**, que em fan sentir com un fill més de la família. Ah! I als **avis**, que això de poder tornar a ser nèt és un privilegi fantàstic!

- A la meua família, especialment al meu **pare**. En aquest camí, tots junts hem viscut una època difícil. Tot i això, utilitzant la paraula "junts" hem arribat al que som i al que sempre hem estat: una família unida que mira endavant amb il·lusió i amb ganes de compartir tant els bons moments com els que no ho són tant.

- A la **Gemma**, la companya de camí més fidel. La que sempre ha estat amb mi, tant si pujava dalt d'un pic vertiginós com si lliscava per una tartera. Fa anys que compartim experiències, i més des de fa un any, quan començarem "el nostre viatge de milers de quilòmetres". Compartint-ho tot amb ella, el que és bo es torna millor i el que és dolent es dilueix. La meua tesi és també, sense cap dubte, la seua tesi.

Per últim, voldria dedicar aquesta tesi a la meua mare, que fou sempre una gran companya de trajecte. De fet, fou sempre una gran guia, però, inesperadament, va haver d'abandonar el camí quan tan sols n'havíem caminat una quarta part. En un principi el camí es feu més feixuc, però com he anat dient, gràcies a la majoria de persones que he anat citant, poc a poc vaig anar fent un pas rere l'altre fins a arribar, per fi, dalt d'aquest cim tan espectacular.

Des d'ara mateix, el camí continua i no sé cap a on em portarà. Possiblement alguns de nosaltres prendrem camins diferents i serà difícil coincidir de nou. Tot i això, a mi m'agrada pensar que quan algú s'acomiada no marxa del tot mentre en quedi el record i jo no us oblidaré mai.

Pere

INDEX

Índex

I. INTRODUCCIÓ	1
A. Toxicitat dels Nitrils	3
A.1 Introducció.....	3
a.1.1 Els nitrils i la seva toxicitat.....	3
a.1.2 Neurotoxicitat dels nitrils.....	4
a.1.2.1 Introducció.....	4
a.1.2.2 Malalties neurològiques associades als nitrils.....	6
a.1.2.2.1 Una hipòtesi unificadora del latirisme, el konzo i la TAN.....	8
A.2. Toxicitat dels nitrils a sistemes sensorials.....	10
a.2.1. Nitrils amb toxicitat sensorial.....	10
a.2.1.1. IDPN.....	10
a.2.1.1.1. Toxicitat visual.....	11
a.2.1.1.2. Toxicitat vestibular.....	13
a.2.1.1.3. Toxicitat auditiva.....	19
a.2.1.1.4. Toxicitat olfactiva.....	21
a.2.1.2. Al·lilnitril.....	22
a.2.1.2.1. Toxicitat visual.....	23
a.2.1.2.2. Toxicitat vestibular.....	23
a.2.1.2.3. Toxicitat auditiva.....	24
a.2.1.2.4. Toxicitat olfactiva.....	25
a.2.1.3. <i>cis</i> -Crotononitril.....	25
a.2.1.3.1. Toxicitat visual.....	25
a.2.1.3.2. Toxicitat vestibular.....	26
a.2.1.3.3. Toxicitat auditiva.....	27
a.2.1.3.4. Toxicitat olfactiva.....	27
A.3. Axonopatia neurofilamentosa.....	27
a.3.1. Introducció.....	27
a.3.2. Biologia dels neurofilaments.....	29
a.3.3. Intoxicació amb IDPN com a model d'axonopatia proximal.....	30
a.3.3.1. Estudis del mecanisme d'acció axonopàtica de l'IDPN a la rata.....	30

a.3.3.2. Implicació de l'alteració dels FI a la toxicitat vestibular de l'IDPN.....	33
a.3.3.3. Acció axonopàtica de l'IDPN en altres espècies.....	34
A.4 Degeneració neuronal per nitrils al Sistema nerviós Central.....	36
a.4.1 Generalitats.....	36
a.4.2 Efectes de l'IDPN.....	37
a.4.3 Efectes del <i>trans</i> -crotononitril.....	37
a.4.4 Efectes de l'hexadienenitril.....	40
A.5. Resum dels efectes neurotòxics de l'IDPN, del <i>cis</i> -crotononitril, del <i>trans</i> -crotononitril i de l'hexadienenitril a la rata.	40
B. Metabolisme dels Nitrils	41
B.1. Introducció.....	41
B.2. Mediació del metabolisme hepàtic en la toxicitat dels nitrils.....	42
b.2.1. Introducció.....	42
b.2.2. El citocrom P4502E1 (CYP2E1).....	43
b.2.3. El citocrom P4502E1 en el metabolisme dels nitrils.....	43
b.2.3.1. El citocrom P4502E1 en el metabolisme de l'IDPN.....	44
b.2.3.2. El citocrom P4502E1 en metabolisme d'altres nitrils.....	44
b.2.3.3. Possibles vies metabòliques pel <i>cis</i> -crotononitril i l'al·lilnitril.....	47
C. Tècniques d'avaluació de la Neurotoxicitat	48
C.1. Introducció.....	48
C.2. Tècniques histològiques	49
C.3. Tècniques comportamentals	49
C.4. Tècniques quimicoanalítiques.....	50
II. OBJECTIUS	53
III. RESULTATS	57

Capítol 1: Classificació dels nitrils segons els seus efectes histopatològics i comportamentals a la Rata	59
Resum article 1.....	61
Article 1.....	65
«Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles». BOADAS-VAELLO, Pere; RIERA, Judith; LLORENS, Jordi <i>Toxicological Sciences</i> , 2005, núm. 88, pàg. 456-466	
 Capítol 2: Toxicitat vestibular en espècies mamífers i no mamífers	77
Resum article 2.....	79
Article 2.....	81
«Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs and frogs». SOLER-MARTÍN Carla; DÍEZ-PADRISA Núria; BOADAS-VAELLO Pere; LLORENS Jordi. <i>Toxicological sciences</i> , 2006, núm. 96, pàg. 123-132	
 Capítol 3: Mediació del citocrom P4502E1 en el metabolisme del <i>cis</i>-crotononitril i l'al·lilnitril en el Ratolí.	91
Resum article 3.....	93
Article 3.....	95
«Determination of cyanide and nitriles in mice and rat whole blood based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography nitrogen phosphorus detection». BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Eric; LLORENS, Jordi; BAYONA, Josep M. <i>Journal of Chromatography B</i> (en revisió).	
Resum article 4.....	115
Article 4.....	117
«Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of <i>cis</i> -crotononitrile in the mouse». BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; DÍEZ-PADRISA, Núria; BAYONA, Josep M; LLORENS, Jordi. <i>Toxicol. Appl. Pharmacol</i> , 2007, núm. 225, pàg. 310-317.	

Resum article 5.....	125
Article 5.....	127
«Role of CYP2E1-mediated metabolism in al·lilnitrile toxicity in the mouse». BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; CHABBERT, Christian; BAYONA Josep M; LLORENS, Jordi. (en preparació)	
IV. DISCUSSIÓ	153
V. CONCLUSIONS	169
VI. MATERIAL I MÈTODES	173
A. Materials i compostos químics	
A.1 Compostos químics.....	175
A.2 Animals utilitzats.....	175
A.3 Administració i obtenció de mostres.....	176
A.4 Avaluació de la toxicitat en l'animal viu.....	177
a.4.1 Opacitat de la còrnia.....	177
a.4.2 Funció vestibular.....	178
a.4.2.1 Avaluació del comportament motor espontani.....	178
a.4.2.2 Reflex d'aixecament per la cua.....	179
a.4.2.3 Inhibició per contacte del reflex d'incorporació.....	179
a.4.2.4 Reflex d'incorporació en l'aire.....	179
a.4.3 Camp obert.....	180
a.4.4 Anàlisi del patró de la marxa.....	180
a.4.5 Escala vertical.....	181
A.5 Tècniques histològiques.....	181
a.5.1 Fluoro-Jade B.....	182
a.5.2. Preparació de mostres per SEM.....	183
A.6.- Anàlisis químicoanalítiques.....	184
A.7.- Anàlisis estadístiques.....	184
VII. BIBLIOGRAFIA i URLgrafia	187
Bibliografia.....	189
URLgrafia.....	210
VIII. ABREVIACIONS	211

I
INTRODUCCIÓ

A. Toxicitat dels nitrils

A.1 Introducció

a.1.1 Els nitrils i la seva toxicitat

Els nitrils són compostos químics que contenen el grup *ciano*: $\text{—C}\equiv\text{N}$. Són molt abundants en la naturalesa, però la seva síntesi és també molt important pel gran ventall d'aplicacions que aquests aporten a la indústria (Ahmed i Tieff, 1983). A la naturalesa els trobem, entre d'altres, en forma de glucòsids cianogènics com és el cas de l'amigdalina a les ametlles amargants i la linamarina a la mandioca, i en forma d'aminonitrils, forma que es troba a les lleguminoses del gènere *Lathyrus*. A la indústria s'utilitzen com a dissolvents i productes intermediaris en la síntesi de plàstics, fibres artificials, resines, productes farmacèutics i altres substàncies químiques.

El consum humà o animal de determinats nitrils provoca símptomes similars a la intoxicació per cianur. Aquest fet suggereix que en la metabolització d'aquests nitrils es produeix l'alliberament d'aquest compost i que seria el responsable de la intoxicació aguda. Lang, al 1894, va observar una gran concentració de tiocianat en orina de gossos i conills als quals se'ls havia administrat nitrils per via oral, i va suggerir la possible metabolització d'aquests a cianur (Lang, 1894). Aquest alliberament de cianur va ser confirmat posteriorment per altres investigadors que van treballar amb un ampli espectre de nitrils i amb altres espècies animals (Ohkawa *et al.*, 1972; Willhite i Smith, 1981; Silver *et al.*, 1982; Ahmed i Farooqui, 1982; Tani i Hashimoto, 1984, 1985).

La toxicitat del cianur està ben caracteritzada. El seu mecanisme d'acció es basa principalment en la seva gran afinitat per l'ió fèrric (III) del grup hemo de l'enzim citocrom A3 oxidasa del mitocondri. Quan el cianur s'uneix a aquest enzim es bloqueja el transport d'electrons a la cadena respiratòria i s'interromp la fosforilació oxidativa. L'estimulació directa de cianur als quimioreceptors dels cossos carotidis i de l'aorta produeix hiperpnea. Mentre esdevenen aquestes irregularitats, es produeix la mort de l'individu mitjançant convulsions hipòxiques i fallada respiratòria (Orfila, 1826; Ahmed i Trieff, 1983; Spencer i Schaumburg, 2000).

A la taula 1 es resumeix la letalitat aguda d'alguns nitrils expressats en dosis letals 50 (LD50) (De Vito, 1996; Grogan *et al.*, 1992).

Compost	Estructura	LD ₅₀ (nmol/kg)
Cianur de Potassi	KCN	0,20 (-0,262)
Acetonitril	CH ₃ CN	6,55 (-0,816)
Propionitril	CH ₃ CH ₂ CN	0,65 (0,187)
Butironitril	CH ₃ (CH ₂) ₂ CN	0,57 (0,244)
Isobutironitril	(CH ₃) ₂ CHCN	0,37 (0,432)
3-metilbutironitril	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CN	2,280 (-0,447)
3-dimetilaminopropionitril	(CH ₃) ₂ N(CH ₂) ₂ CN	15,30 (-1,185)
3-isopropilaminopropionitril	(CH ₃) ₂ CHNH(CH ₂) ₂ CN	19,40 (-1,288)
3,3'-iminodipropionitril	HN(CH ₂ CH ₂ CN) ₂	27,50 (-1,439)
3-butenenitril	CH ₂ =CHCH ₂ CN	1,00 (0,000)
3-hidroxiopropionitril	HO(CH ₂) ₂ CN	48,72 (-1,688)

Taula 1. S'expressa la letalitat aguda d'alguns nitrils en LD50 (nmol/kg) després de l'administració en ratolins. Taula adaptada de Grogan *et al.*, 1992.

A l'organisme, el cianur és susceptible de ser biotransformat en tiocianat (SCN⁻), àcid aminotiazolincarboxílic (ATC), cianat (CN⁻) i els seus metabòlits, i cianocobalamina tal com es mostra a la figura 1. El procés més important és la conversió del cianur a tiocianat mitjançant l'enzim rodanasa (Ahmed i Trieff, 1983).

a.1.2 Neurotoxicitat dels nitrils

a.1.2.1 Introducció

Tot i que en un principi la neurotoxicitat dins la toxicologia dels nitrils no va ser considerada com a important per alguns autors (De Vito, 1996), es coneixen nombrosos nitrils que provoquen neurotoxicitat en animals d'experimentació (fig.2). A més existeixen diverses síndromes neurològiques humanes possiblement causades per nitrils.

Usant animals d'experimentació, s'ha observat que hi ha efectes neurotòxics de nitrils que no presenten la toxicitat aguda característica del cianur, com per exemple el

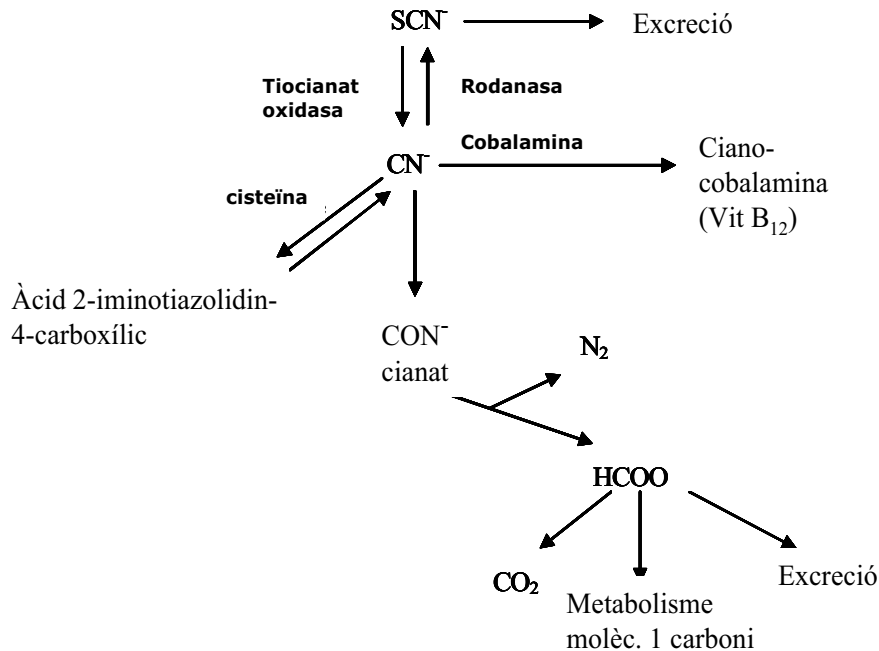


Fig.1 Possibles reaccions implicades en la biotransformació del cianur (CN^-). Esquema adaptat d'Ahmed i Tieff (1983).

DMAPN (dimetilaminopropionitril), l'IDPN (3,3'-iminodipropionitril) i altres que presenten efectes similars a l'IDPN, com el crotononitril i l'al·lilnitril. La neurotoxicitat d'aquests nitrils s'exposa a l'apartat A.2.

En una anàlisi quantitativa de cianur alliberat *in vitro*, en preparacions de microsomes hepàtics, i *in vivo*, mesurant l'excreció de tiocianat (SCN^-) en orina de rata, es va observar que alguns aminopropionitrils neurotòxics alliberen menys cianur que altres nitrils relacionats (Taula 2; Froines *et al.*, 1985). Els nitrils IDPN, DMAPN, MMAPN (monometilaminopropionitril), TMAPN (trimetilaminopropionitril), DMABN (dimetilaminobutironitril) que no indueixen a la rata toxicitat com la descrita per cianur, són precisament els que alliberen menys quantitat d'aquest compost i amb una cinètica més lenta, a diferència del DMAA (dimetilaminoacetoneitril) que té un efecte tòxic similar al cianur.

L'estudi d'aquest tipus de nitrils adquireix importància com a models de neurotoxicitat i de síndromes de toxicitat humanes causades per nitrils d'origen natural.

Compostos	Alliberament HCN (nmol/10 mg proteïna)
Benzenonitril	3370 ± 151
Propionitril	41,6 ± 0,9
Butironitril	56,6 ± 2,2
3,3'-Iminodipropionitril (IDPN)	10,6 ± 2,2
Dimetilaminoacetoneitril (DMAA)	2355 ± 91,5
Dimetilaminopropionitril (DMAPN)	15,4 ± 2,9
β-Aminopropionitril (βAPN)	9,4 ± 1,7
Monometilaminopropionitril (MAMPN)	4,8 ± 2,0
Trimetilaminopropionitril (TMAPN)	89,1 ± 11,4
Dimetilaminobutironitril (DMABN)	0,0
Trimetilaminobutironitril (TMABN)	0,0
Succinonitril	0,0

Taula 2. Anàlisi quantitativa d'àcid cianhídric alliberat durant el metabolisme d'aminonitrils neuro tòxics i compostos relacionats en microsomes hepàtics in vitro. Taula adaptada de Froines *et al.* (1985).

a.1.2.2 Malalties neurològiques associades als nitrils

En els anys 1976-1977, es va introduir el DMAPN ($(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$) en el procés de síntesi de l'escuma de poliuretà que s'utilitza per a la manufacturació dels seients dels automòbils. Mesos després, els treballadors de la planta industrial van desenvolupar una neuropatia perifèrica i presentaven alteracions en la sensibilitat cutània, amb parestèsia a peus i mans, i una important afectació gènito-urinària amb dificultats de micció i disfunció sexual. Mitjançant estudis epidemiològics, clínics i amb animals d'experimentació es va demostrar que el responsable de les alteracions neurològiques dels treballadors era el DMAPN (Pestronk *et al.*, 1980).

També s'han pogut associar alteracions neuronals al consum de certs vegetals com les guixes i varietats amargues de la mandioca, els quals contenen compostos nitrílics.

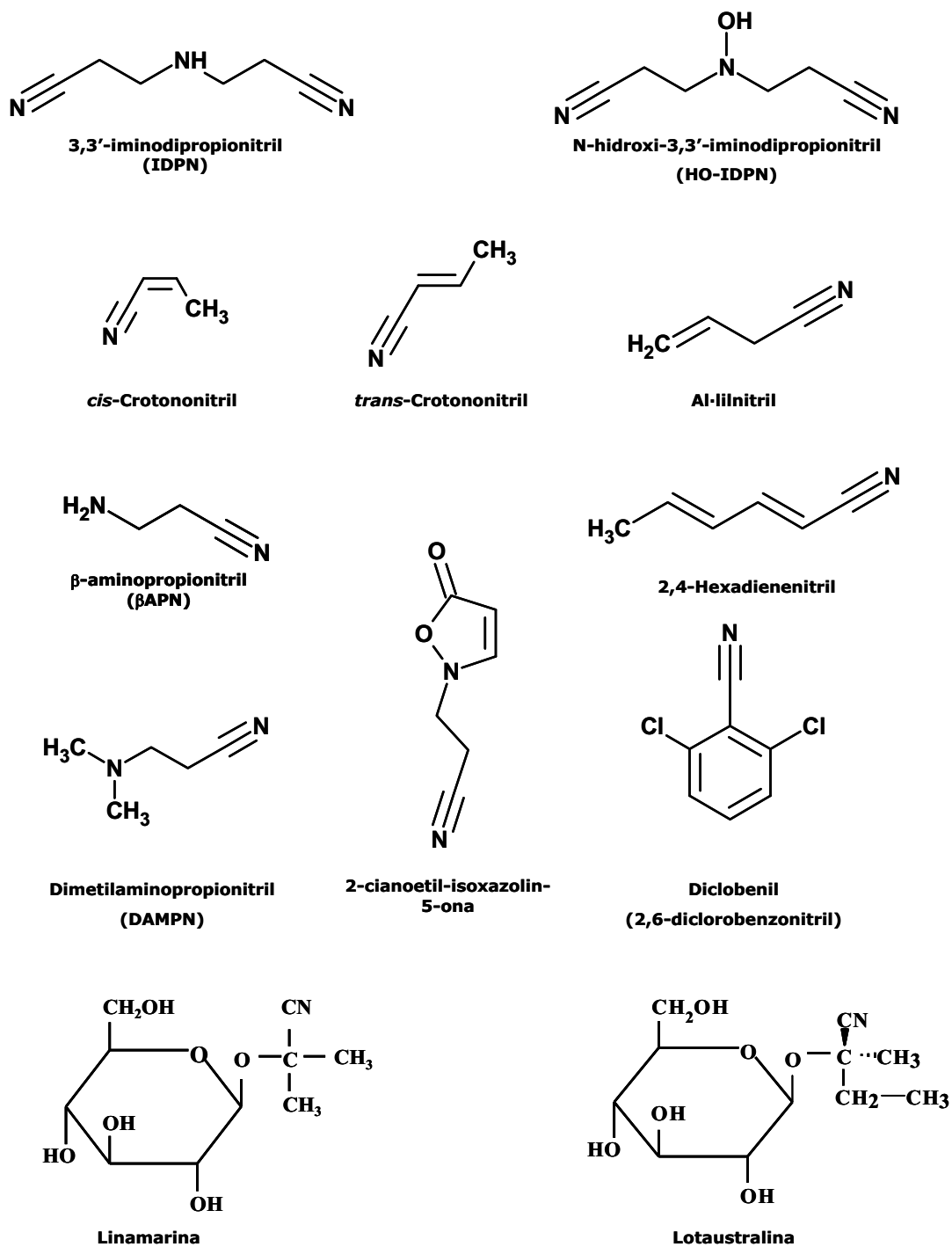


Fig. 2 Estructures moleculars d'alguns nitrils neurotòxics i de gluconitrils de la mandioca

a.1.2.2.1 Una hipòtesi unificadora del latirisme, el konzo i la TAN.

El latirisme i el konzo són dues malalties amb una clínica idèntica (Tylleskär, 1994), caracteritzada per una paraparèsia espàstica bilateral simètrica (Spencer *et al.*, 1986; Giménez-Roldán *et al.*, 1994; Tshala-Katumbay, 2001) (fig. 3.A) En el dos casos, la malaltia es produeix quan l'escassetat d'aliment porta al consum d'un vegetal tòxic com a base alimentària durant un mínim de diverses setmanes. El latirisme està causat per un llegum, la guixa (*Lathyrus sativus*) (fig. 3.B). Al llarg de la història, el latirisme ha afectat repetidament nombroses zones d'Àsia, Àfrica i Europa, i destaca l'epidèmia a Espanya a finals de la guerra civil (Giménez-Roldán *et al.*, 1994). Actualment el latirisme és present a Bangladesh, Etiòpia, Pakistan, Índia, Nepal i Afganistan.

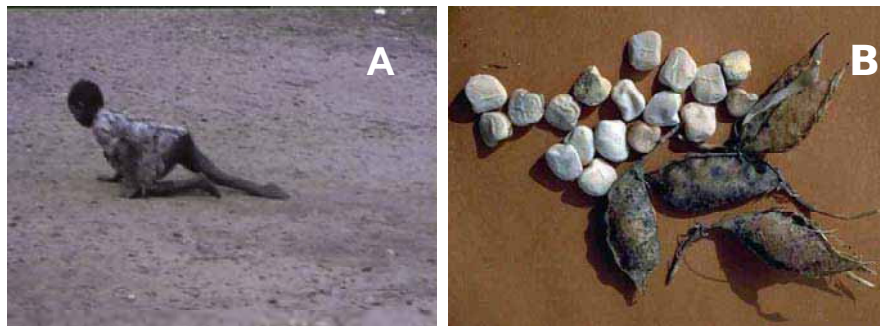


Fig. 3 A La fotografia mostra un nen malalt de konzo amb incapacitat per a la marxa bípeda. **B** Llavors de *L. Sativus* (guixes)

El konzo apareix de forma sobtada associat al consum de tubercles de varietats amargues de mandioca (*Mahinot esculenta*, Cranz) com a principal font d'hidrats de carboni (Tylleskär *et al.*, 1992; BaneaMayambu *et al.*, 1997). S'han caracteritzat focus de konzo al Congo, Tanzània, Moçambic i República Centrafricana.

A diferència del konzo i el latirisme, la neuropatia atàxica tropical (TAN) és una malaltia progressiva caracteritzada per mielopatia, atròfia òptica, sordesa sensorial bilateral i polineuropatia (Osuntokun, 1968; Oluwole *et al.*, 2000). Tot i ser totalment diferent del konzo, la TAN està causada també pel consum de mandioca però amb un patró de consum diferent: molts anys de consum de productes de mandioca amb un contingut menor de tòxics que en el cas del Konzo.

La mandioca conté elevades concentracions de gluconitrils, principalment la linamarina (fig. 2) (2-[β -D-glucopiranosiloxi]isobutironitril, > 90% del total dels nitrils) i lotaustralina (fig.2) (<10% del total dels nitrils) (White *et al.*, 1998). El processament de la mandioca permet que la linamarina s'hidrolitzi mitjançant la linamarasa, una β -glucosidasa present a les parets cel·lulars de la pròpia planta, s'alliberin cianohidrines (β -hidroxinitrils) i aquestes es descomponguin espontàniament en acetona i cianur (HCN), a pH neutre, a temperatures majors de 35°C o en presència de l'hidroxinitril liasa (White *et al.*, 1998) (fig. 4).

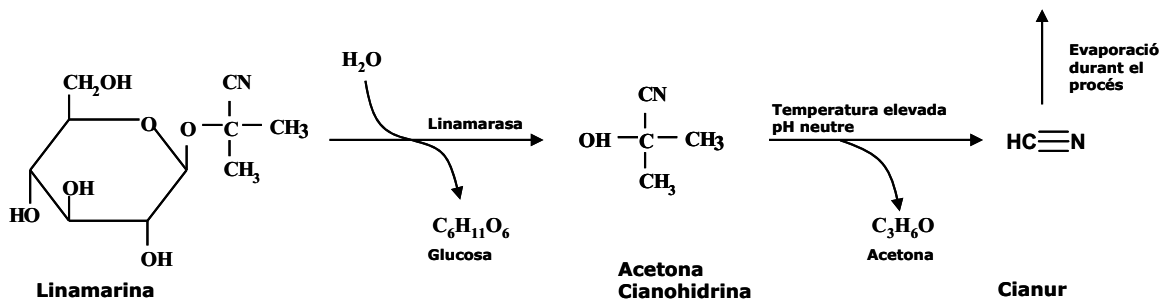


Fig. 4 Esquema de la metabolització de la linamarina

Així, el consum de mandioca implica una exposició a cianur a dosis que varien en funció del contingut de gluconitrils a la planta i del grau de processament.

En un intent de determinar la causa del latirisme es va identificar el β -aminopropionitril (BAPN, NH₂-CH₂-CH₂-CN) com a component tòxic a llavors de *L. odoratus* (McKay *et al.*, 1954; Schilling i Strong, 1954; Dasler, 1954). En *L. sativus* però, no es troba ni BAPN ni el seu derivat γ -glutamil i s'ha suggerit que la responsable de la toxicitat d'aquest llegum podria ser la 2-cianoetil-isoxazolin-5-ona (Lambein *et al.*, 1993). Aquest compost heterocíclic pot ser fotolísat o metabolitzat a BAPN, i produeix alteracions de l'esquelet en rates, conills, pollastres (Selye, 1957) i en un 12% de pacients humans amb neurolatirisme (Haque *et al.*, 1997).

Tot i que la majoria d'autors considerin l'aminoàcid excitotòxic 3-N-oxalyl-L-2,3-diaminopropanoic (β -ODAP) com a causant del latirisme (Rao *et al.*, 1969; Barrow *et al.*, 1974), no s'han obtingut proves suficients per poder-ho acceptar plenament. Per exemple, el principal suport de la hipòtesi d'aquest aminoàcid excitotòxic per al latirisme és la descripció d'un model animal de toxicitat del β -ODAP que sembla reproduir part de la clínica del latirisme (Spencer *et al.*, 1986), però aquest treball no ha estat ni reproduït ni continuat. La hipòtesi global del nostre grup és que el

desenvolupament tant del konzo com del latirisme i de la TAN podria ser causat per nitrils presents a la mandioca i a les guixes. Aquesta hipòtesi és unificadora ja que proposa una causa comuna per a dues malalties que clínicament són idèntiques (konzo i latirisme) i per a dues malalties diferents (konzo i TAN) causades pel mateix aliment tòxic. El camí necessari per arribar a demostrar aquesta hipòtesi passa per avançar en el coneixement de la neurotoxicitat dels nitrils. Aquest és el principal objectiu amb què estem treballant actualment, caracteritzant els patrons de neurotoxicitat dels nitrils que són al nostre abast, identificant els requeriments estructurals de la molècula que confereix la neurotoxicitat d'aquests i estudiant la relació de les lesions tissulars i els dèficits funcionals que desencadenen.

A.2. Toxicitat dels nitrils a sistemes sensorials

Com és sabut, els éssers vius disposem de mecanismes biològics sensibles a diferents tipus d'energia rellevants per a la supervivència: els receptors sensorials. Aquests poden ser d'origen neuronal (olfactoris, cutanis, propioceptius i interoceptius) o d'origen epitelial (receptors de la visió, l'oïda, l'equilibri i el gust).

Com veurem als apartats següents, existeixen diferents nitrils amb toxicitat sensorial que provoquen problemes d'olfacte, de visió, d'oïda, d'equilibri... Principalment es farà referència als efectes tòxics sensorials de l'IDPN (p. ex. Seoane *et al.*, 1999), el *cis*-crotononitril (p. ex. Balbuena i Llorens, 2003) i l'al·lilnitril (p. ex. Balbuena i Llorens, 2001).

a.2.1. Nitrils amb toxicitat sensorial

a.2.1.1. IDPN

La neurotoxicitat de l'IDPN es va determinar en un principi pel quadre clínic permanent que aquest provocava en rates de laboratori, que consistia en alteracions del comportament espontani (Delay *et al.*, 1952). Aquesta síndrome es caracteritza pel moviment repetitiu i anòmal del cap, retropulsió, moviments en cercle, hiperactivitat i dificultats per nedar. (Delay *et al.*, 1952; Thuillier i Burger, 1954). Aquesta síndrome s'anomenà ECC (*Excitation with Choreiform and Circling movements*) per Selye (1957), o síndrome de ball de vals (*Waltzing*) (Goldin *et al.*, 1948; Thuillier i Burger, 1954).

Inicialment es va intentar explicar aquesta síndrome en termes patològics hipotetitzant que seria conseqüència de l'acció axonopàtica de l'IDPN. Tot i això, estudis posteriors han demostrat que l'IDPN provoca degeneració de les cèl·lules ciliades del vestíbul (fig. 9) i que aquest efecte explica la síndrome comportamental (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Demêmes, 1994; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001).

a.2.1.1.1. Toxicitat visual

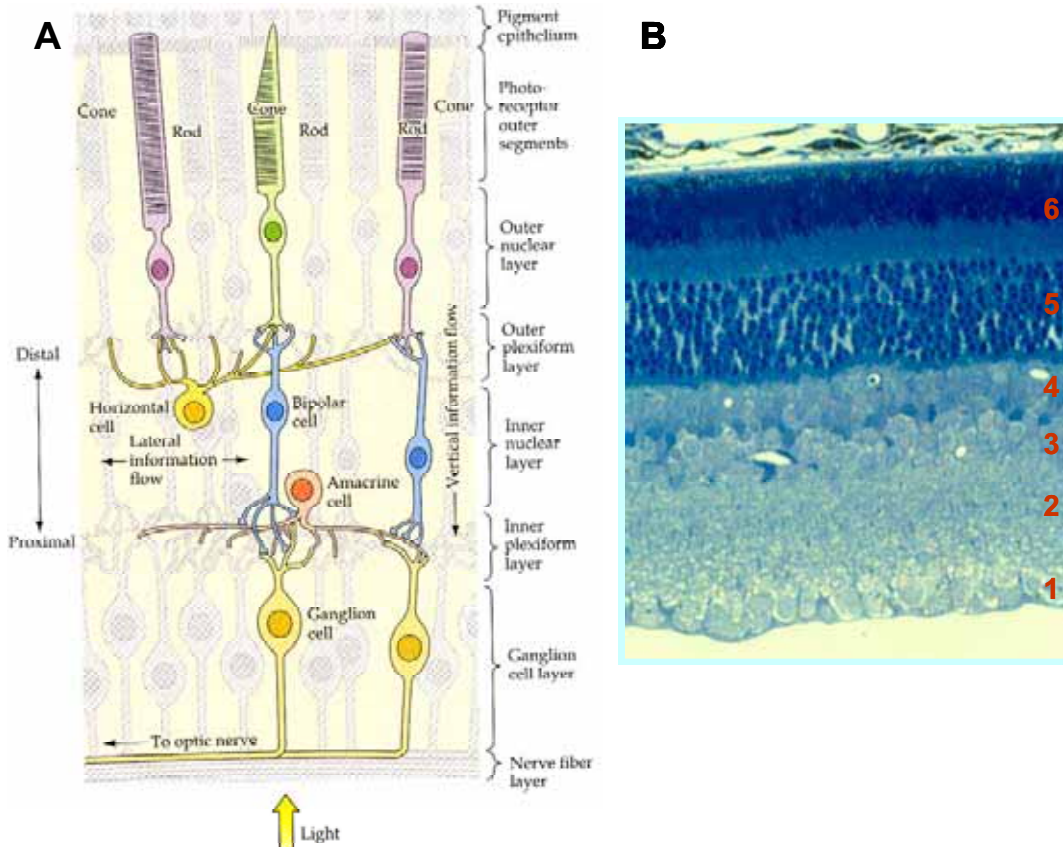


Fig. 5 Estructura de la retina. **A** Esquema de Purves *et al.* (1997). **B** Tall semifi de retina (blau de Toluídina) 1- Capa de cèl. ganglionars de la retina, 2- Paret plexiforme interna de la retina, 3- Capa nuclear interna de la retina, 4- Paret plexiforme externa de la retina, 5- Capa nuclear externa de la retina, 6- Capa de fotoreceptors de la retina

Selye (1957) va descriure els efectes tòxics de l'IDPN al sistema visual de la rata, del ratolí, del gat i de la mona. Concretament, aquests efectes eren opacitat de còrnia, despreniment de retina, hemorràgies i exsudats inflamatoris intraoculars. Treballs posteriors confirmaren aquests efectes (Forgacs, 1960; Health i Rutter, 1966; Barone *et al.*, 1995) i es destacaren canvis en l'electroretinograma (Wang i Health, 1968),

cosa que indica que la retina i el sistema vascular de l'ull eren possibles dianes d'acció toxicològica de l'IDPN.

Barone *et al.* (1995) estudiaren el curs temporal i la corba dosi-resposta de la neurotoxicitat de l'IDPN a la retina. Observaren dilatació somatodendrítica de les neurones de la capa nuclear interna i hemorràgia focal entre l'epiteli pigmentat i la retina. Posteriorment apareixia un despreniment complet de la retina que es mantenia només per unions amb el cos ciliar i el disc òptic. Paral·lelament observaren una degeneració de la capa nuclear interna i de la capa nuclear externa, i nombrosos macròfags s'infiltraren en el nou espai sota la retina. Amb el temps, la retina tornava al seu lloc de forma progressiva des del centre a la perifèria i quedava de nou unida al disc òptic, i l'epiteli pigmentat es regenerava completament. Tot i això, les estructures neuronals de la retina continuaven lesionades, s'observava una pèrdua parcial de neurones de les capes nuclears interna i externa, i la resta presentaven una clara desorganització. Abans del despreniment de retina, apareixien alteracions en estructures no neuronals que incloïen opacitat de còrnia, invasió de granulòcits a la substància pròpia de la còrnia i a la cambra anterior, i pèrdua d'afinitat de la substància pròpia a la tinció de Nissl. Tot i això, aquestes alteracions són transitòries.

Per altra banda, hi ha altres treballs que utilitzen la proteïna àcida fibril·lar de glia (GFAP) com a marcador de toxicitat visual. La retina dels mamífers té dos tipus de macroglia: els astròcits i les cèl·lules de Müller. Els astròcits de retina són escassos i la majoria d'ells es troben associats a la capa ganglionar i al nervi òptic de la retina, especialment al voltant dels vasos sanguinis, i expressen GFAP de manera constitutiva. Les cèl·lules de Müller són presents a tota la retina i formen part de la seva estructura de suport. El cos cel·lular de les cèl·lules de Müller es localitza a la capa nuclear interna i presenta dues elongacions, una dirigida cap a la membrana limitant interna i l'altra cap a l'externa, que s'expandeixen per tota la retina (De Raad *et al.*, 1996; Humphrey i Moore, 1996). Igual que en altres cèl·lules gials, les cèl·lules de Müller poden expressar GFAP. A la retina d'un animal control, les cèl·lules de Müller pràcticament no expressen GFAP (Bignami i Dahl, 1979; De Raad *et al.*, 1996). Tot i això, una lesió a la retina causa una reacció de gliosi en la qual participen tant els astròcits com les cèl·lules de Müller de la retina. L'activació d'aquesta glia inclou un augment en l'expressió de GFAP observada mitjançant immunohistoquímica (Bignami i Dahl, 1979;

Lewis *et al.*, 1989; Barone *et al.*, 1995; De Raad *et al.*, 1996; Humphrey i Moore, 1996).

Seoane *et al.* (1999), utilitzant la GFAP com a marcador de toxicitat visual, van estudiar la gliosi associada a la degeneració retinal induïda per IDPN a la rata. Les rates van ser administrades amb dosis d'IDPN de 0 a 400 mg Kg⁻¹ dia⁻¹ tres dies consecutius, i sacrificades en diferents grups des d'un dia després de l'administració fins a 16 setmanes després. Com a resultats principals van determinar un efecte reversible d'opacitat de còrnia i increments de GFAP dosi i temps dependents. Analitzant aquest resultat juntament amb la resta d'inclosos en aquest treball (fig.6), es pot afirmar que la GFAP és un bon biomarcador per a determinar el nivell de degeneració de la retina induïda per IDPN i a la vegada obre la porta a utilitzar l'anàlisi de GFAP per a caracteritzar la toxicitat visual d'altres compostos.

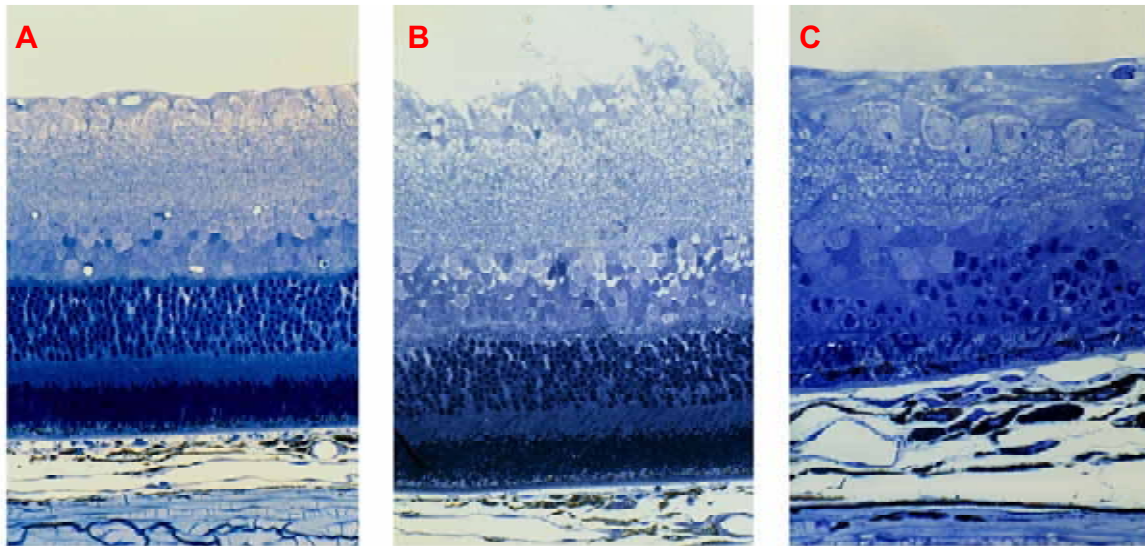


Fig. 6 Efectes de l'IDPN (400 mg kg⁻¹ dia⁻¹ x 3 dies) sobre la morfologia de la retina. Talls semifins (1µm) de retines incloses en Epon i tenyides amb blau de toluïdina. **A** Control amb salí. **B** Quatre setmanes després de l'administració d'IDPN. Evident dilatació cel·lular a les capes nuclears interna i externa. **C** 16 setmanes després de l'administració. Marcada degeneració retinal.

a.2.1.1.2. Toxicitat vestibular

L'IDPN provoca degeneració de les cèl·lules ciliades del vestíbul (fig. 9) i aquest efecte explica la síndrome comportamental ECC associada a aquest nitril (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Demêmes, 1994; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001).

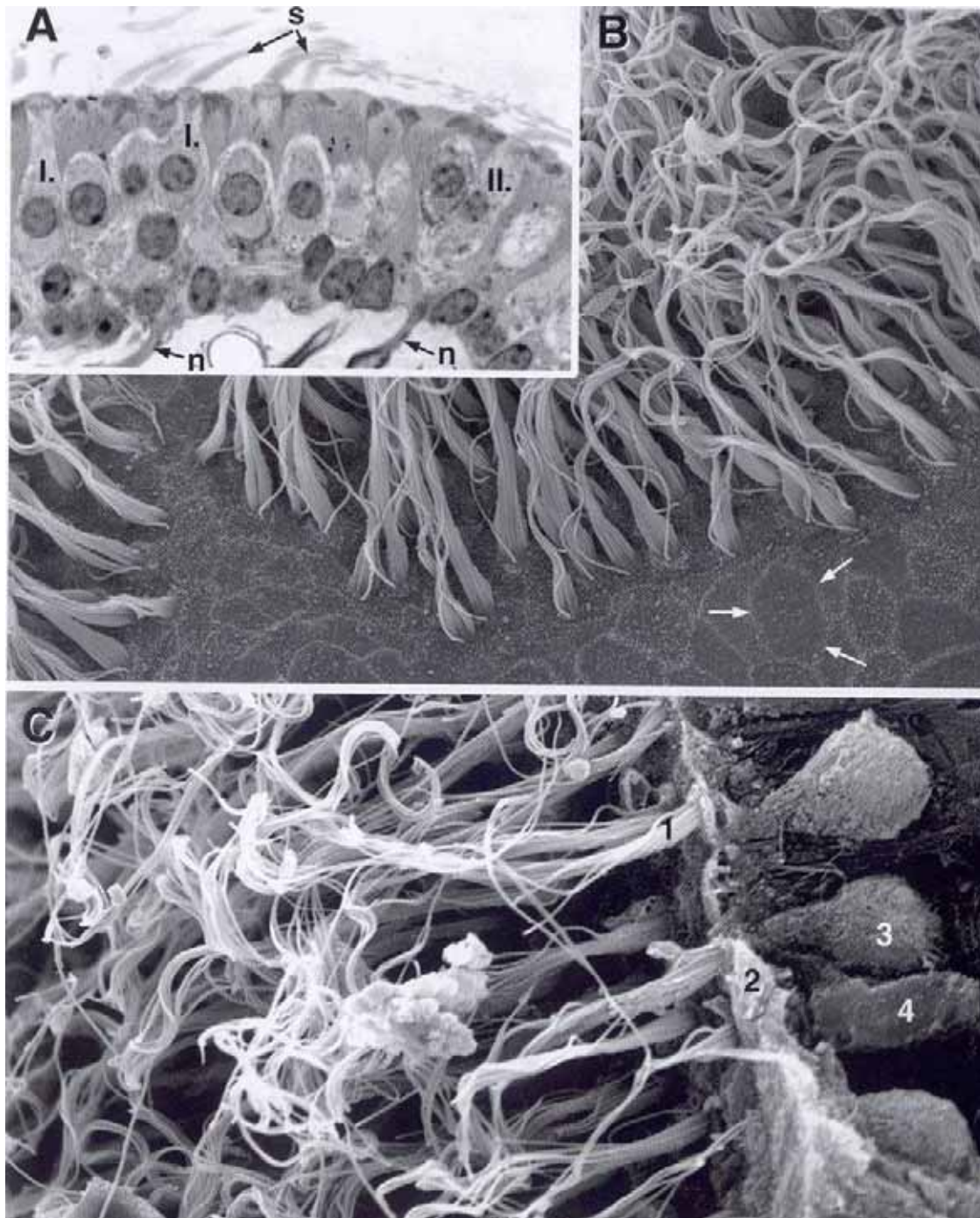


Fig. 7 Epiteli vestibular de rata. **A** Microscòpia òptica d'una cresta vestibular. (I) Cèl. ciliades tipus I, (II) Cèl. ciliades tipus II, (s) Estereocilis, (n) Fibres nervioses. **B** Superfície de la cresta sense la cúpula. Les estructures poligonals (fletxes) són les cèl·lules de suport amb les microvellositats. **C** Vista lateral de les CC de la cresta: (1) Estereocilis; (2) Làmina reticular que separa els cossos cel·lulars de l'espai endolimfàtic; (3) Cèl. ciliada tipus I; (4) Cèl. ciliada tipus II.

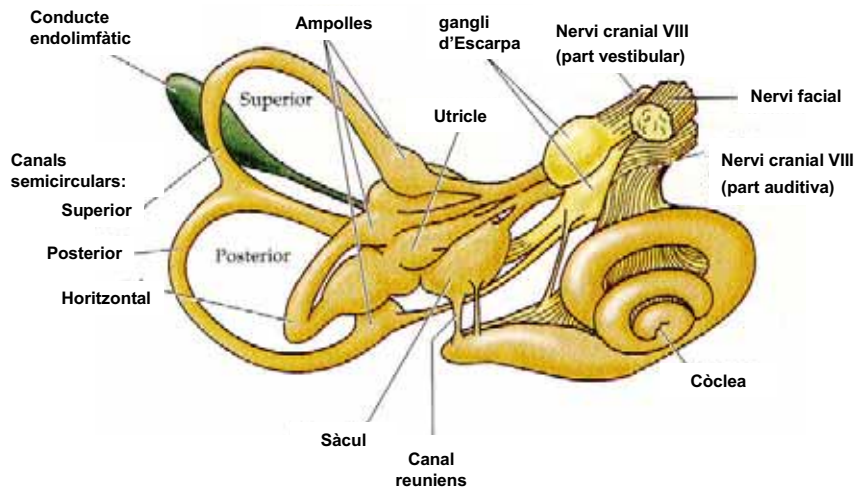


Fig. 8 El laberint i la seva innervació. Esquema modificat de Purves (1997)

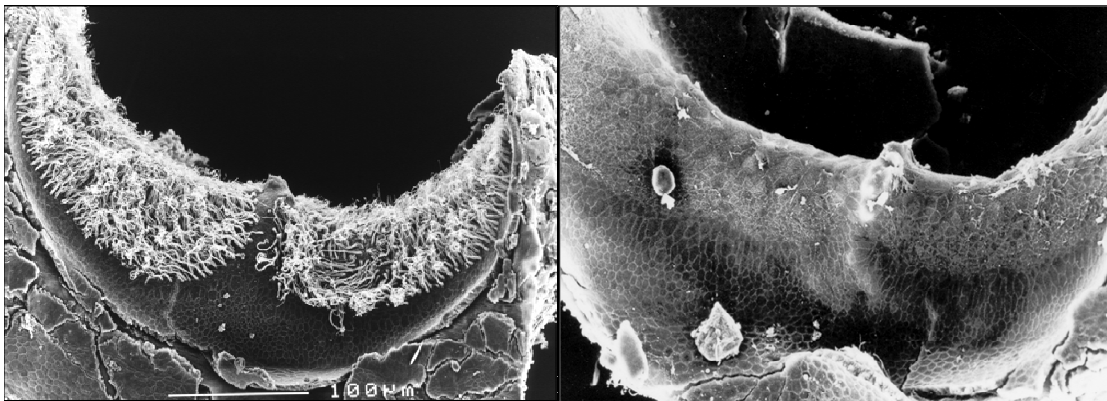


Fig. 9 Degeneració de cèl·lules ciliades de la cresta de l'epiteli vestibular de rata. Esquerra: cresta control. Dreta: degeneració total de CC per l'administració d'IDPN.

Hi ha una clara similitud entre l'alteració del comportament espontani de les rates tractades amb IDPN i la síndrome ECC de línies mutants de ratolins i conills d'índies i altres animals intoxicats amb arsanilat de sodi (Anniko i Wersäll, 1977; Sobin i Wersäll, 1983; Demêmes i Sans, 1985; Wenngren i Anniko, 1989) i de les rates sotmeses a laberintectomia quirúrgica bilateral (Llorens *et al.*, 1993b) o a una injecció intratimpànica bilateral d'àcid arsanílic (Llorens i Rodríguez-Farré, 1997).

L'IDPN induïx degeneració de les cèl·lules ciliades (CC) vestibulars a les mateixes dosis agudes a les quals es poden observar canvis en el comportament dels animals (400-1000mg/kg, i.p.; Llorens *et al.*, 1993b) i que són menors a les dosis utilitzades

en els estudis axonopàtics (2000mg/kg, i.p.; Chou i Hartmann, 1964). Per altra banda, l'exposició subcrònica d'IDPN en aigua de beguda és vestibulotòxica a concentracions de 0.2 - 0.4%, majors que les necessàries (0.05-0.1%) per a induir axonopatia (Llorens i Rodríguez-Farré, 1997). Al cap de tres mesos d'exposició a aquestes últimes concentracions d'IDPN, l'animal no presenta pèrdua de CC ni síndrome ECC, però sí axonopatia (Clark *et al.*, 1980; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997).

L'efecte degeneratiu de l'IDPN afecta tota la superfície de l'epiteli sensorial vestibular. Tot i això, s'observen diferències de sensibilitat entre regions intraepitelials, les més sensibles de les quals són les regions apicals de les crestes i l'estriola de les màcules, i interepitelials, en què són més sensibles les crestes que els utricles i els sàculs (crestes > utricles > sàculs). Aquest patró regional de diferències de sensibilitat a l'IDPN és el mateix que està descrit per altres compostos vestibulotòxics com els antibiòtics aminoglicosídics (Aran *et al.*, 1982; Sera *et al.*, 1987; Takumida *et al.*, 1989). Els factors intrínsecs responsables d'aquestes diferències de sensibilitat no han estat encara identificats. Tot i això, s'han descrit característiques que varien entre les CC de diferents àrees de l'epiteli sensorial vestibular, i que inclouen el temps de maduració durant el desenvolupament (Sans i Chat, 1982), diversos tipus d'innervació aferent amb diferents propietats morfològiques, electrofisiològiques i bioquímiques (Baird *et al.*, 1988; Goldberg *et al.*, 1990; Desmadryl i Deschesne, 1992), i marcadors bioquímics específics de grups de CC (Deschesne *et al.*, 1988; Demêmes *et al.*, 1993). Recentment, s'han descrit aquestes diferències de sensibilitat en epitelis vestibulars en cultius tractats amb estaurosporina, un agent inductor d'apoptosi, la qual cosa recolza la hipòtesi que són degudes a factors intrínsecs (Forge i Li, 2000).

L'estudi histològic de la degeneració de l'epiteli vestibular de la rata exposada a l'IDPN mostra que les CC de tipus I són més sensibles que les del tipus II (Llorens i Demêmes, 1994), observació que s'ha descrit també amb altres vestibulotòxics (p. ex. estreptomina; Lee i Kimura, 1994). Després d'una exposició aguda d'IDPN, la degeneració de les CC es caracteritza per la presència de vacúols en el citoplasma, la distribució i la morfologia dels quals suggereixen que s'originen a partir del reticle endoplasmàtic (Llorens i Demêmes, 1994). Malgrat que les fibres nervioses aferents i eferents es mantenen a l'epiteli vestibular durant la degeneració de les CC que innerven, s'observa una desaparició dels contactes entre CC i la terminal nerviosa, i es perden també les densitats sinàptiques (Llorens i Demêmes, 1994). Aquesta

observació contrasta amb la descripció de terminals nervioses en degeneració de l'SNC, on persisteixen les densitats pre i postsinàptiques, fins i tot després d'una degeneració completa del botó presinàptic (p. ex. Gentschev i Sotelo, 1973). Posteriorment a la degeneració completa de la CC, s'evidencia una degeneració de les fibres nervioses, cosa que suggereix que aquesta última esdevé com un efecte secundari de la toxicitat vestibular de l'IDPN (Llorens i Demêmes, 1994). Quan la vacuolització és extensa, els estereocilis apareixen alterats (Llorens i Demêmes, 1994), de manera similar a la degeneració de CC induïda per antibiòtics aminoglicosídics (Lenoir i Puel, 1987; De Groot *et al.*, 1991).

Posteriorment, Seoane *et al.* (2001a), demostraren que la pèrdua de CC per intoxicació amb IDPN es pot donar per necrosi, apoptosi o extrusió cap a l'espai endolimfàtic dependent del tipus d'administració d'aquest nitril. Van determinar que el predomini d'un tipus o altre de mort cel·lular variava segons la intensitat de l'estímul degeneratiu, amb predomini de la necrosi a dosis agudes altes, l'apoptosi a models intermitjos i l'extrusió com a mode predominant durant la intoxicació crònica a dosis menors.

En un altre treball, Seoane *et al.* (2001b), van caracteritzar els efectes ultraestructurals de l'exposició subcrònica d'IDPN a l'epiteli sensorial. Observaren proextrusió i extrusió de CC de les crestes i els utricles de rates exposades a IDPN 0.2% en aigua de beguda durant com a mínim 5 setmanes. Exposicions a temps menors, mostraren signes patològics com la formació d'una butllofa a la superfície apical de les CC, dilatació, retracció i fragmentació de les terminals nervioses aferents, separació de les CC de les estructures del voltant i pèrdua de les densitats pre i postsinàptica que caracteritzen les membranes que connecten les CC i les seves terminals aferents. A partir de les observacions obtingudes en aquest treball van proposar una seqüència d'esdeveniments que condueixen a la degeneració de l'epiteli i l'extrusió de les CC (fig.10) que suggeria una pèrdua de la integritat estructural de l'epiteli, que començaria a les terminals nervioses o en els contactes cèl·lula - cèl·lula, i que provocaria una lesió epitelial i la pèrdua de les CC. En resum, el resultat obtingut permeten plantejar alternatives a la hipòtesi inicial que defensava que l'IDPN tenia una acció tòxica específica sobre les CC. Seoane *et al.* (2003) estudiaren posteriorment la relació entre els filaments intermedis (FI) i la degeneració de CC i

suggeriren que l'alteració del citoesquelet de les terminals nervioses podria causar la pèrdua de les CC.

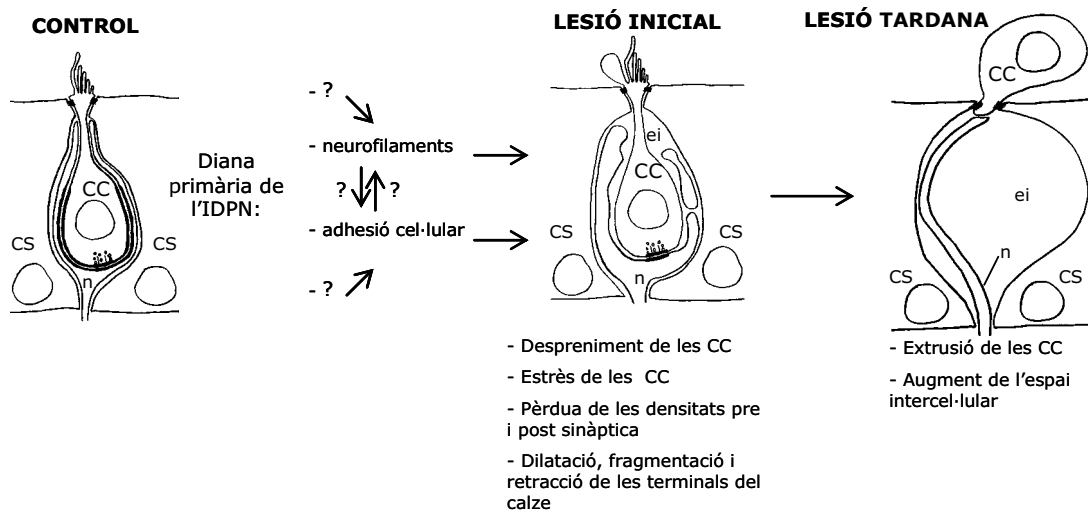


Fig. 10 Proposta de la seqüència d'esdeveniments que porten a l'extrusió de les CC (Seoane *et al.*, 2001b). Les CC tipus I i les terminals aferents del calze poden ser lesionades abans que altres tipus de cèl·lules i de terminals nervioses. La principal diana d'acció de l'IDPN encara no ha estat identificada però els NF del calze aferent i els mecanismes d'adhesió de les cèl·lules són els principals candidats a ser-ho. Altres mecanismes candidats serien l'alteració de l'equilibri iònic i alteracions en els neurotransmissors. Els efectes sobre la diana principal conduirien a una lesió primària de les CC i de les terminals nervioses, i això provocaria posteriorment l'extrusió de la CC i la desorganització epitelial (CC: cèl. Ciliada; CS: cèl. de suport; n: terminal nerviosa; ei: espai intercel·lular)

L'any 1987 es va demostrar que en aus adultes hi havia regeneració de CC audiovestibulars (Cotanche, 1987; Cruz *et al.*, 1987; Cotanche, 1997). En mamífers, concretament en conill d'índies, es van trobar CC immadures a l'epiteli vestibular després de l'exposició a antibiòtics aminoglicosídics (Forge *et al.*, 1993, 1998; Warchol *et al.*, 1993; Rubel *et al.*, 1995; Li i Forge, 1997). A les rates exposades a IDPN, no s'han observat indicis de regeneració de CC (Llorens *et al.*, 1993b), de manera que l'aparent recuperació funcional de rates tractades amb 400 mg/kg d'IDPN a les 3 setmanes de l'administració, s'explicaria més fàcilment com a resultat d'una compensació comportamental basada en la informació sensorial provinent de les CC restants en un epiteli vestibular parcialment lesionat (Llorens *et al.*, 1993b).

Per últim, sabent que les alteracions en el comportament espontani en rates sotmeses a una bilabirintectomia persisteixen com a mínim sis mesos postcirurgia sense que hi hagi compensació de les deficiències vestibulars amb els sistemes visuals i

propioceptius (Porter *et al.*, 1992), es suggereix que l'IDPN no només provoca l'aparició de la síndrome ECC sinó que també és responsable de la seva permanència.

a.2.1.1.3. Toxicitat auditiva

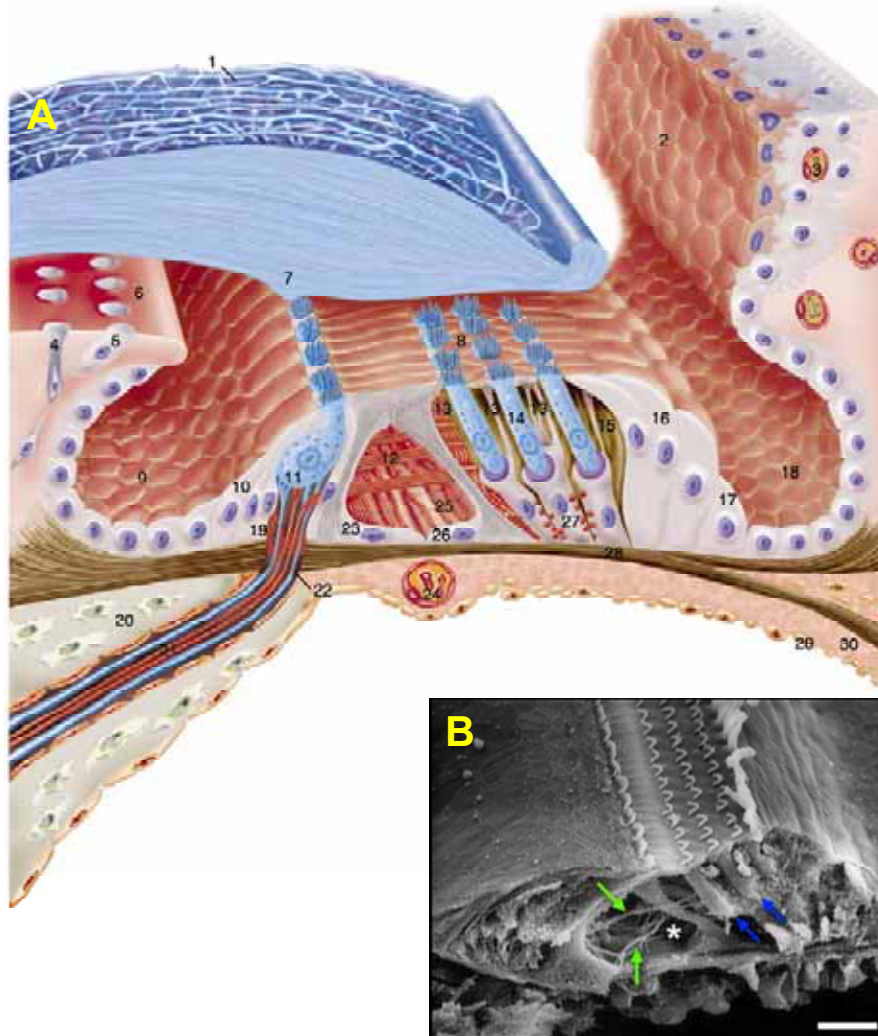


Fig. 11 Components de l'òrgan de Corti. **A** Esquema 1- Membrana tectorial, 2- Estria vascular, Capil·lar, 4- Dents acústiques, 5- Cèl. Interdentals, 6- Limbe de la làmina espiral òssia, 7- Estria de Hensen, 8- Làmina reticular, 9- Solc espiral intern, 10- Cèl. de Held, 11- CC interna, 12- Fibres del nervi coclear per les CC externes, 13- Canals de Nuel (*cuniculum intermedium*), 14- CC externes, 15- Canal extern (*cuniculum externum*), 16- Cèl. de Hensen, 17- Cèl. de Claudius, 18- Solc espiral extern, 19- Cèl. interna falangeal, 20- Limbe de la làmina espiral òssia, 21- Fibres coclears aferents (blau) i eferents (vermell), 22- Habènula perforata, 23- Barra interna, 24- Vas espiral, 25- Canal intern de Corti, 26- Barra externa, 27- Cèl. externa falangeal, 28- Làmina basilar, 29- Cèl. Perilimfàtiques, 30- Cresta basilar. **B** Superfície amb CC i interior de l'òrgan de Corti (microscòpia de rastreig). Les fletxes blaves indiquen les CC externes i l'asterisc el canal de Corti on s'encreuen les fibres nervioses (fletxes verdes).

La toxicitat auditiva de l'IDPN va ser observada per primera vegada en rates per Wolff (Wolff *et al.*, 1977), que va observar com aquestes perdien la resposta de sobresalt davant estímuls auditius. Després de tres dies d'exposició aguda a IDPN, les rates perden la capacitat de sentir sons d'altres freqüències (p. ex. 40 kHz), i dos dies més tard els de freqüències mitjanes (p. ex. 5 kHz) (Crofton i Knight, 1991; Llorens i Crofton, 1991). Utilitzant audiometria per modificació de reflexos s'observà que les diferències auditives es presenten en un ampli espectre de freqüències des de 0.5 a 80 kHz (Crofton *et al.*, 1994). El registre de potencials evocats del centre auditiu del tronc de l'encèfal confirma l'augment dels llindars auditius a diferents freqüències, la qual cosa indica que la lesió es localitza a la còclea i no en estructures retrococleares (Crofton *et al.*, 1994). Els estudis morfològics de l'òrgan de Corti de rates tractades amb IDPN mostren que la degeneració incrementa progressivament en la direcció basal a apical, amb una major afectació de les CC externes que de les internes (Crofton *et al.*, 1994). Aquesta alteració auditiva és similar a la descrita pels ototòxics aminoglicosídics (Stebbins *et al.*, 1969; Wersäll, 1973). L'IDPN, de manera dosi-dependent també causa degeneració de les cèl·lules ganglionars de l'òrgan de Corti (Crofton *et al.*, 1994).

Davant la similitud entre les CC del vestíbul i les auditives, i havent-se demostrat la capacitat de l'IDPN a induir tant efectes tòxics vestibulars com auditius, Seoane *et al.* (2005) hipotetitzaren que les CC auditives podien eliminar-se mitjançant un procés d'extrusió amb una exposició subcrònica d'IDPN, de la mateixa manera que en les CC vestibulars. Observaren un procés d'extrusió cel·lular anàleg al que s'observa en les crestes i utricles vestibulars amb la formació inicial d'una butllofa a la superfície apical de les cèl·lules, just darrera dels estereocilis, una fusió posterior dels cilis i una extrusió de la CC cap a l'espai luminal. Tot i això, a diferència de les CC vestibulars, no es troben CC auditives totalment extruïdes de l'epiteli i de fet sembla ser que a diferència del que passa en el vestíbul, les CC de l'òrgan de Corti podrien degenerar abans de la seva extrusió completa. Aquest treball va permetre confirmar, a més, que són només les CC les que pateixen l'extrusió i que aquesta degeneració es dona de forma progressiva des de la part basal de l'òrgan de Corti cap a la part apical, de manera molt similar al que passava amb l'exposició aguda d'IDPN (Crofton *et al.*, 1994).

a.2.1.1.4. Toxicitat olfactiva

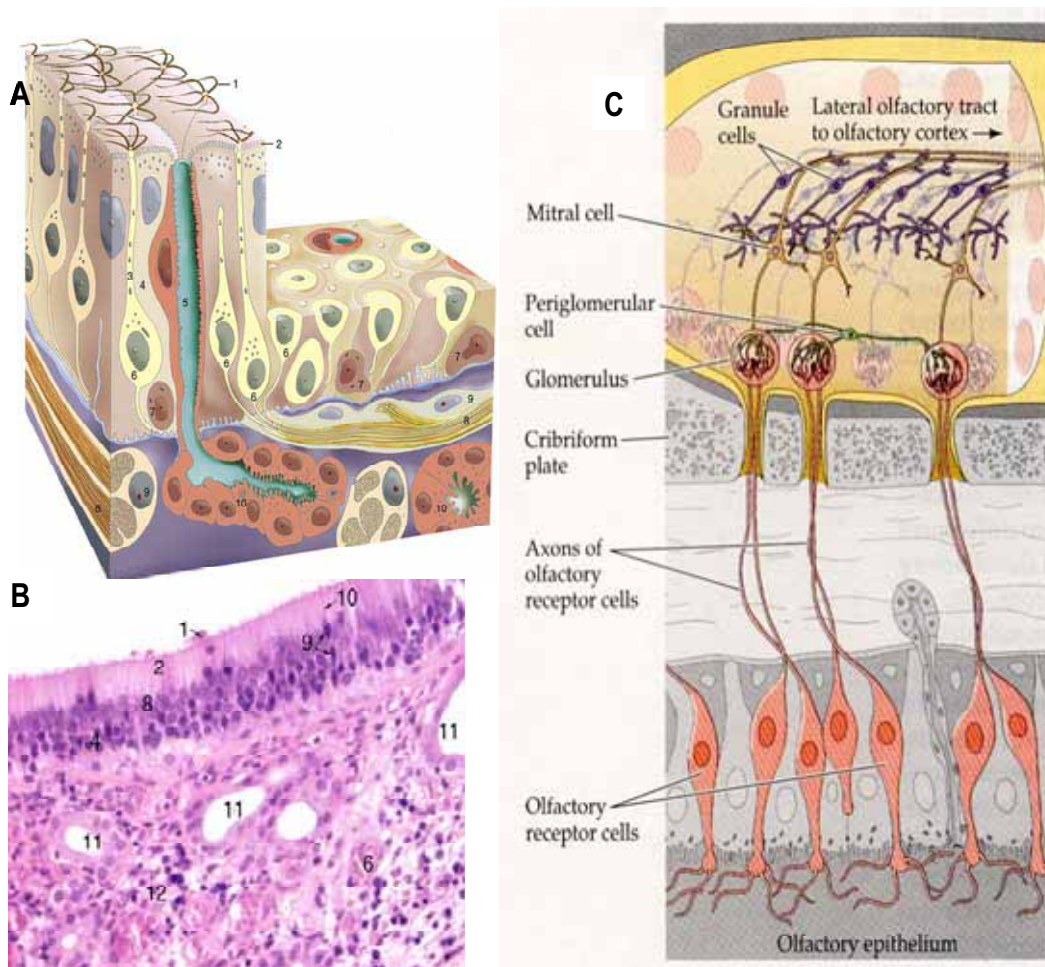


Fig. 12 Epiteli olfactivi. **A** Esquema epiteli olfactivi adaptat i modificat per Bannister *et al.* (1999), *Grey's Anatomy*. 1- Cilis de cèl. olfactives (ONR), 2- Microvellositats de les cèl. de suport, 3- Procés dendrític d'ORN, 4- Cèl. de suport, 5- Conducte excretor de la glàndula de Bowman, 6- Pericari d'ORN, 7- Cèl. basal, 8- Axons olfactivis, 9- Beina glial d'axons olfactivis, 10- Acini de Bowman. **B** Mucosa olfactiva nasal (tinció HE) 1- Mucus, 2- Capa superficial no nuclear, 4- Capa de cèl. basals, 6- Beina del plexe subepitelial venós, 8- Nuclis de cèl. de suport, 9- Cossos cel·lulars i nuclis d'ORN, 10- Procés dendrític d'ORN, 11- Glàndules de Bowman, 12- Làmina pròpia rica en cèl. **C** Epiteli olfactivi i bulbs olfactivis. Esquema de Purves *et al.* (1997)

L'IDPN, administrat intraperitonealment en rates, provoca la degeneració de l'epiteli olfactivi de la zona del meat medial dorsal (DMM) (Genter *et al.*, 1992) (fig.13). 24 hores després d'una sola dosi d'IDPN 400 mg/kg, s'observa una degeneració d'entre un 15 i un 20% de l'àrea que ocupa la mucosa olfactiva. A les 48 hores de l'administració comencen processos de regeneració i reparació del teixit olfactivi lesionat, processos que duren aproximadament 8 setmanes. Tot i això, el teixit regenerat presenta algunes seqüeles com metaplàsies i fibroplàsies en àrees adjacents al meat dorsal.

La degeneració de l'epiteli olfatori per part de l'IDPN es pot determinar per l'augment d'immunoreactivitat de GFAP en els bulbs olfactoris (BO) (Genter *et al.*, 1992; Llorens *et al.*, 1993). S'ha observat que aquest augment de GFAP en els BO es correlaciona amb la degeneració de les terminals aferents induïda per la lesió de les neurones olfàctories de la cavitat nasal (Genter *et al.*, 1992).

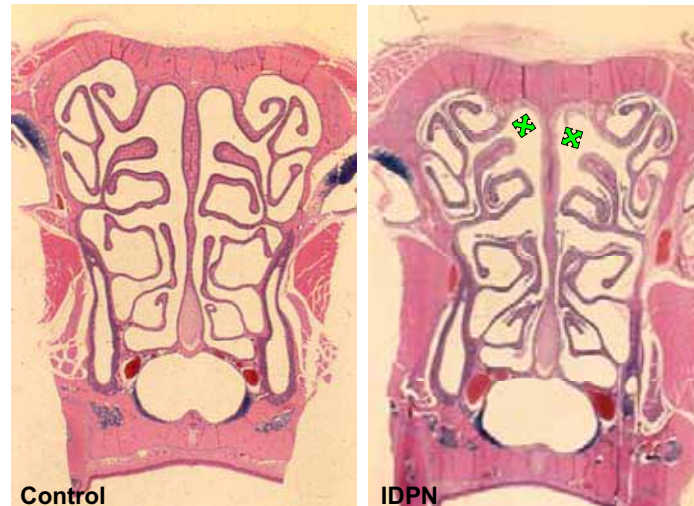


Fig. 13 Degeneració de la mucosa olfàctòria per IDPN (Genter *et al.*, 1992). Les creus verdes marquen la degeneració d'aquest epitelí després de la intoxicació amb IDPN

a.2.1.2. Al·lilnitril

L'al·lilnitril o 3-butenenitril ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CN}$) induïx una alteració del comportament espontani en rates (Tanii *et al.*, 1989b, 1991a) semblant a la que s'observa amb l'IDPN.

Aquest compost, a més de sintetitzar-se industrialment, és present en diversos vegetals del grup de les crucíferes, com per exemple el bròquil, la col i les cols de Brussel·les (Tanii H. *et al.* 2003). Tot i això, els resultats obtinguts fins al moment, suggereixen que el consum diari d'aquests vegetals porta a un consum inferior al nivell d'al·lilnitril necessari per a provocar efectes neurotòxics al consumidor (Tanii H. *et al.*, 2004).

S'ha publicat que l'al·lilnitril causa alteracions en el metabolisme de la serotonina, la dopamina i la noradrenalina en diverses àrees del cervell (Tanii *et al.*, 1991b, 1993), degeneració neuronal a l'habènula medial i el nucli del rafe (Zang *et al.*, 1999), i

alteracions dels sistemes GABAèrgics ascendents del nucli habènula medial interpeduncular del rafe i de la substància negra (Tanii *et al.*, 2000). Tot i això, cap d'aquestes observacions planteja una hipòtesi coherent sobre els efectes comportamentals dels nitrils.

a.2.1.2.1. Toxicitat visual

El tractament agut amb al·lilnitril produeix opacitat de còrnia reversible (Balbuena i Llorens, 2001), similar a l'IDPN (Selye, 1957; Forgacs, 1960; Barone *et al.*, 1995).

Per altra banda, rates exposades a al·lilnitril presenten gliosi reactiva a la retina, cosa que suggereix la presència de neurodegeneració. (Balbuena i Llorens, 2001). Tot i això, aquests efectes no han estat encara del tot demostrats.

a.2.1.2.2. Toxicitat vestibular

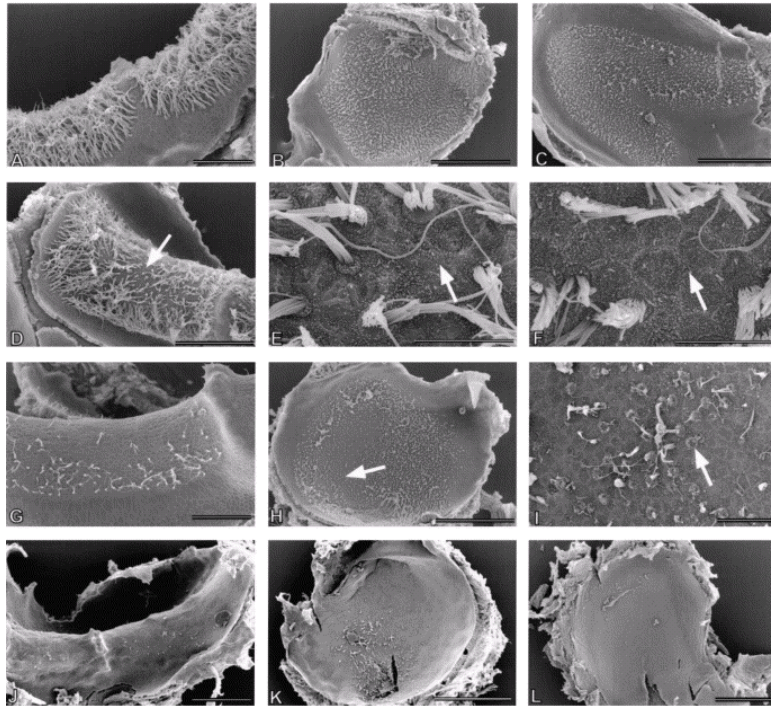


Fig. 14 Balbuena i Llorens 2001. Efectes de l'al·lilnitril a l'epiteli sensorial vestibular (Fotografies per SEM 28 dies després de l'administració). **A-C** Cresta, utricle i sàcul respectivament d'una rata administrada amb 20 mg kg⁻¹ dia⁻¹ x 3 dies. Aparença similar a la d'animals control **D-F** A més augments, però, s'observa una lleugera pèrdua de CC (fletxes) **G-I** Cresta, utricle i sàcul respectivament d'una rata administrada amb 40 mg kg⁻¹ dia⁻¹ x 3 dies. Pèrdua quasi completa de CC a la cresta, evident pèrdua a l'estriola de l'utricle (fletxa) i en el sàcul. **J-L** Cresta, utricle i sàcul respectivament d'una rata administrada amb 60 mg kg⁻¹ dia⁻¹ x 3 dies. Pèrdua completa de CC. Escala en µm: A=50, B=200, C=200, D=100, E=10, F=10, G=50, H=200, I=20, J=100, K=200, L=200

De manera molt similar a l'exposició a IDPN, l'al·lilnitril causa degeneració de les CC del sistema vestibular, que afecta en major grau les crestes vestibulars respecte als utricles i els sàculs (Balbuena i Llorens, 2001). Balbuena i Llorens (2001) demostren que, a l'igual que l'IDPN, els efectes sobre el comportament espontani (síndrome ECC) s'expliquen per la seva toxicitat sensorial: per la degeneració de les CC del vestíbul (fig. 14).

a.2.1.2.3. Toxicitat auditiva

L'exposició aguda d'al·lilnitril $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ i.p. durant tres dies, indueix una pèrdua completa de CC externes i una degeneració dels esterocilis de les CC internes a les parts mitjana i basal de l'òrgan de Corti, i una pèrdua parcial de CC externes a la part apical d'aquest òrgan (Balbuena i Llorens, 2001) (fig. 15).

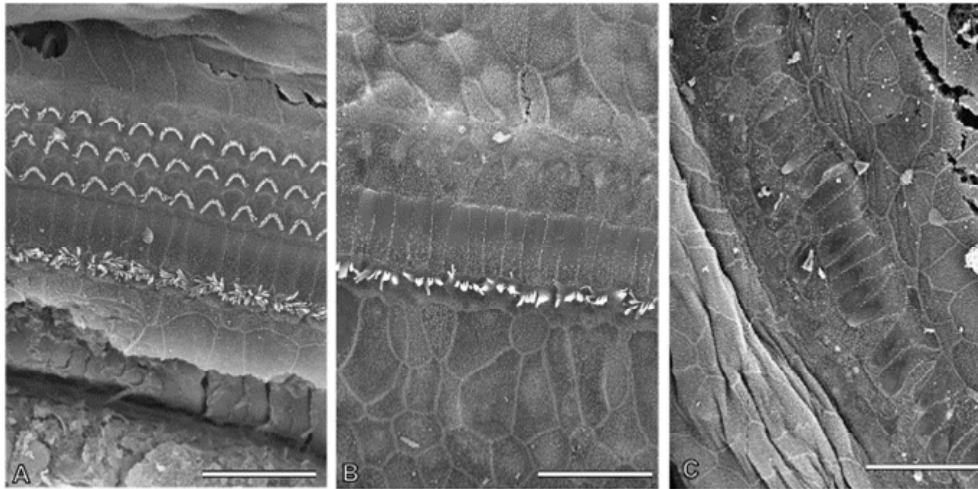


Fig. 15 Balbuena i Llorens 2001. Efectes de l'al·lilnitril a l'òrgan de Corti (fotografies SEM 28 dies després de l'administració). **A** Part medial de rata $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. Aparença normal. **B** Part medial de rata $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. Pèrdua completa de CCs externes i alteracions estructurals de les CCs internes. **C** Part apical de rata $60 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. Pèrdua completa de CCs externes i internes. Escala = $20 \mu\text{m}$.

Per altra banda, l'exposició subcrònica d'aquest nitril, administració oral de $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ durant 12 setmanes (cinc dies per setmana), causa una desaparició dels potencials evocats auditius del tronc encefàlic (Gagnaire *et al.*, 2001) i de CC externes i internes de l'òrgan de Corti, de manera similar als efectes descrits per l'al·lilnitril a dosis aguda, del crotononitril (Gagnaire *et al.*, 2001) i de l'IDPN (Crofton *et al.*, 1994).

a.2.1.2.4. Toxicitat olfactiva

Les rates exposades a al·lilnitril, a l'igual que a la retina, presenten gliosi reactiva en els bulbs olfactoris, la qual cosa suggerieix la presència de neurodegeneració a la mucosa (Balbuena i Llorens, 2001). Tot i això, aquests efectes no han estat encara del tot demostrats.

a.2.1.3. Cis-crotononitril

El *cis*-crotononitril és un dels dos isòmers corresponents a l'anomenat crotononitril o 2-butenenitril ($\text{CH}_3\text{-CH}=\text{CH-CN}$), nitril que es comercialitza en forma de solució barreja de dos isòmers, *cis* i *trans*, amb una ràtio aproximada de *cis:trans* de 60:40. Aquesta barreja dels dos isòmers, indueix la síndrome ECC en animals d'experimentació de forma similar a l'IDPN (Tanii *et al.*, 1989a, 1991) i toxicitat en el sistema vestibular (Llorens *et al.*, 1993b, 1998).

Estudiant per separat la neurotoxicitat dels dos isòmers obtinguts per destil·lació, s'observa que l'isòmer *trans* provoca dèficits motors d'activitat vertical, mentre que l'isòmer *cis* provoca toxicitat sensorial (Balbuena i Llorens, 2003).

a.2.1.3.1. Toxicitat visual

Els animals tractats amb crotononitril barreja presenten opacitat de còrnia (Llorens *et al.*, 1998), similar a l'IDPN (Selye, 1957). En el cas del *cis*-crotononitril, aquesta opacitat de còrnia és dosi-dependent i s'observa sobretot en rates tractades amb $120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies consecutius i és molt evident entre 2 i 4 dies després de l'administració (Balbuena i Llorens, 2003). Aquest efecte és reversible i generalment les rates recuperen la transparència de la còrnia al cap d'1 o 2 setmanes després de l'administració (Balbuena i Llorens, 2003).

Per altra banda, s'ha observat un increment de GFAP a la retina dosi-dependent (Balbuena i Llorens 2003). La gliosi a la retina és evident tant a 1 com a 4 setmanes després de l'administració, però només en les rates administrades amb $120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. A dosis inferiors no s'observaven augments de GFAP a la retina (Balbuena i Llorens 2003).

a.2.1.3.2. Toxicitat vestibular

El crotononitril barreja dels dos isòmers, indueix als animals d'experimentació la síndrome ECC de manera similar a l'IDPN (Tanii *et al.*, 1989a, 1991) i toxicitat en el sistema vestibular (Llorens *et al.*, 1993b, 1998). A la dosi màxima utilitzada de $150 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies consecutius, similar a la LD50 (Tanii *et al.*, 1989a), no s'arriba a la destrucció completa de l'epiteli vestibular (Llorens *et al.*, 1998). Es demostra que el grau de lesió vestibular es correlaciona amb l'alteració del comportament espontani (Llorens *et al.*, 1998), a l'igual que s'observa amb l'IDPN (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997).

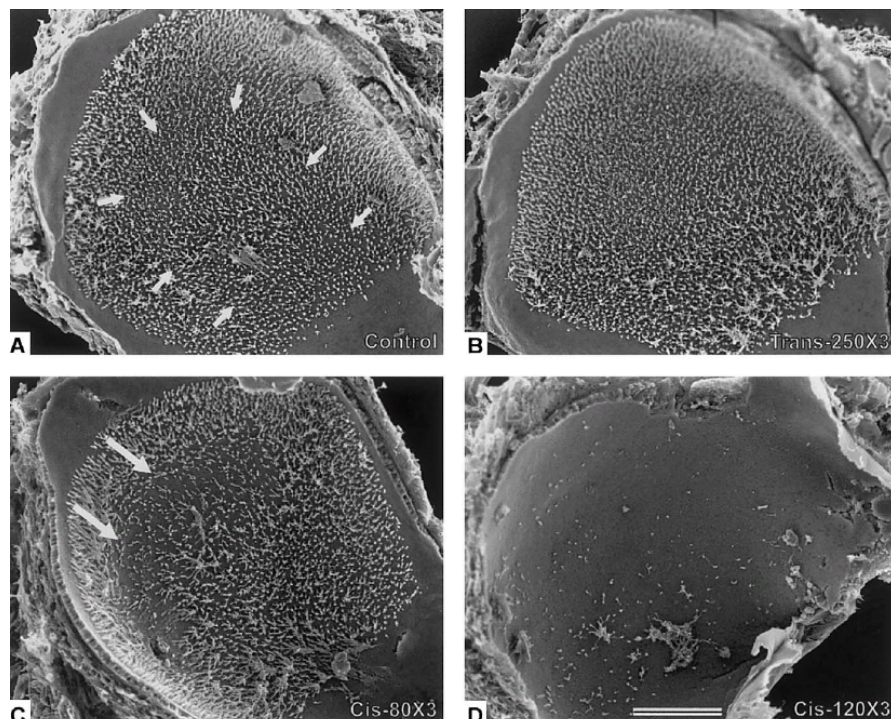


Fig. 16 Balbuena i Llorens 2003. Efectes dels isòmers del crotononitril. Microscòpia electrònica de rastreig 28-30 dies després de l'administració. **A** Utricle control. Les fletxes indiquen la localització aproximada de l'estriola, la línia virtual que separa dos grups de CC de polaritat oposada i això correspon a la part central del receptor. **B** Utricle de rata *trans*-crotononitril $250 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. Aparença control **C** Utricle de rata *cis*-crotononitril $250 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. Pèrdua de CC a l'estriola (fletxes). **D** Utricle de rata *cis*-crotononitril $250 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \times 3$ dies. Pèrdua pràcticament completa de CC. Escala $100 \mu\text{m}$

Estudiant l'isòmer *cis* per separat, s'ha observat que, igual que en el cas de l'IDPN i l'al·lilnitril, provoca pèrdua de cèl·lules ciliades de l'epiteli vestibular (fig.16) (Balbuena i Llorens 2003) i aquest fet explica les alteracions del comportament espontani que

presenten els animals administrats. Per contra, l'isòmer *trans* no mostra aquesta toxicitat vestibular.

a.2.1.3.3. Toxicitat auditiva

L'exposició a crotononitril barreja produeix pèrdua del reflex de reacció a un estímul auditiu (Llorens *et al.*, 1998), com s'observa a l'IDPN (Wolff *et al.*, 1977; Crofton i Knight, 1991). També es mostra una pèrdua completa de cèl·lules ciliades externes i internes de la part basal de l'òrgan de Corti, mentre que a les parts mitjana i apical, la pèrdua d'ambdós tipus cel·lulars és parcial, amb major afectació de les externes (Gagnaire *et al.*, 2001), resultats similars als observats amb l'IDPN (Cofton *et al.*, 1994).

Estudiant l'isòmer *cis* per separat, s'ha observat que provoca una pèrdua dosi-dependent de CC auditives (Balbuena i Llorens 2003), que a l'igual que l'al·lilnitril i l'IDPN, comencen degenerant progressivament les CC de la part basal i finalment les de la part apical.

a.2.1.3.4. Toxicitat olfactiva

El *cis*-crotononitril provoca un augment de GFAP als bulbs olfactoris una setmana després de l'administració de 80, 100 i 120 mg kg⁻¹ dia⁻¹ x 3 dies. Tot i això, quatre setmanes després de l'exposició d'aquest nitril, els nivells de GFAP són similars als observats en rates control.

A.3. Axonopatia neurofilamentosa

a.3.1. Introducció

El sistema nerviós té dos components principals separats anatòmicament, però funcionalment relacionats: sistema nerviós central i sistema nerviós perifèric (SNP).

L'SNP està format per ganglis i nervis que es troben fora de la volta cranial i del canal vertebral, i que comuniquen l'SNC amb la resta de l'organisme, ja sigui portant informació sensorial cap a l'SNC (vies aferents) o portant ordres des de l'SNC cap als

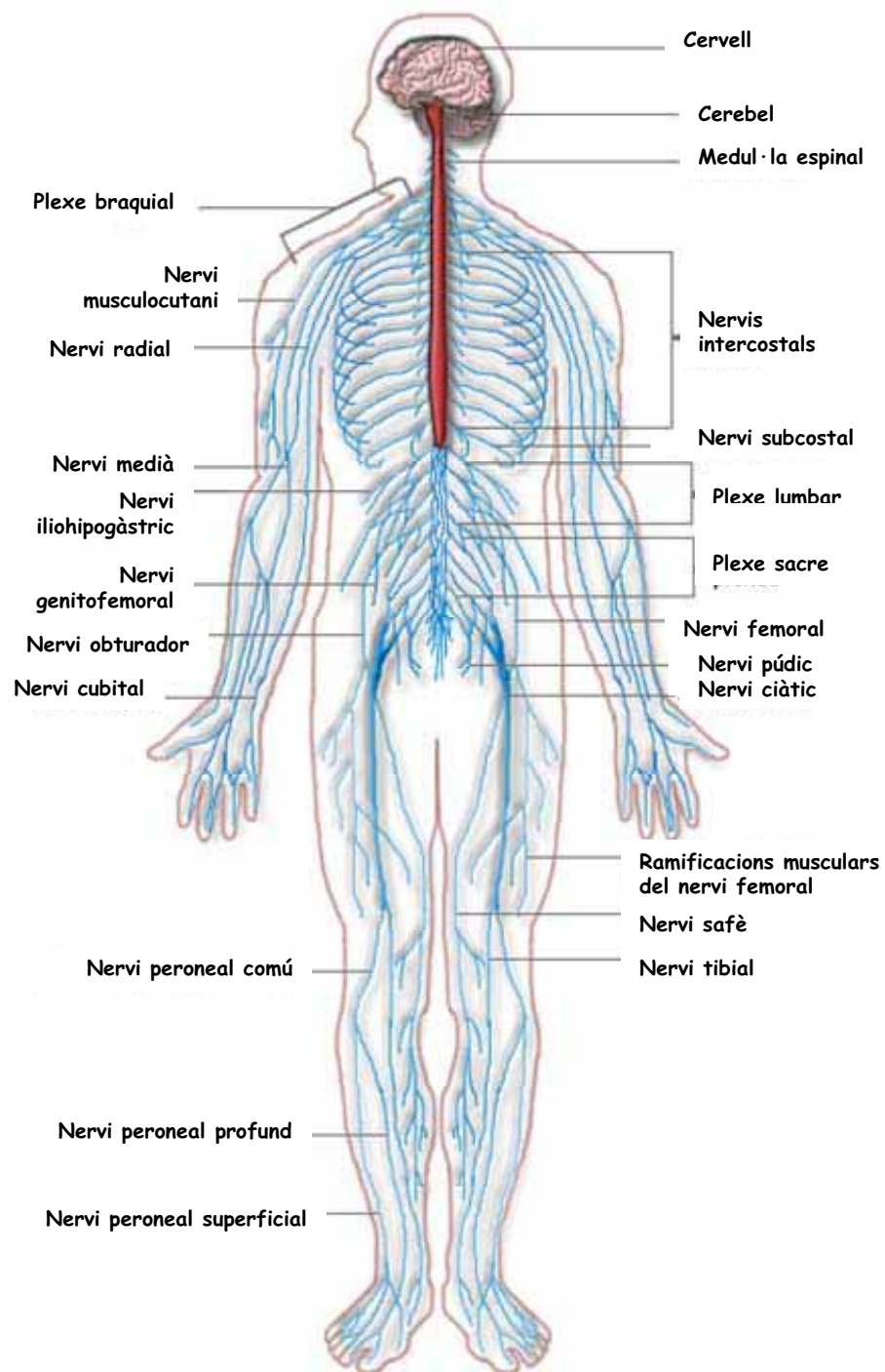


Fig. 17 Esquema general dels Sistema nerviós Central (rosa i taronja) i Perifèric (blau) humà. Adaptació del material didàctic de psicologia de la UOC.

òrgans efectors, músculs i glàndules (vies eferents).

L'SNP és particularment vulnerable als agents químics amb capacitat per causar axonopaties neurofilamentoses. Una axonopatia neurofilamentosa és un desordre

neuropatològic que afecta principalment els axons de les neurones i que es caracteritza per l'acumulació de neurofilaments (NF) dins de l'axó. Com veurem als apartats següents, existeixen nitrils que causen aquest desordre. Un dels més estudiats en aquest sentit ha estat el 3,3'-iminodipropionitril (IDPN) conegut des dels anys seixanta pel seu important efecte axonopàtic (Chou i Hartmann, 1964; Slagel i Hartmann, 1965).

a.3.2. Biologia dels neurofilaments

Els neurofilaments són filaments intermedis (FI) del citoesquelet neuronal i tenen un diàmetre d'entre 8 i 10 nm. Els NF i altres proteïnes neuronals de la superfamília dels FI, estan presents al llarg de l'axogènesi neuronal. A diferència d'altres FI, les proteïnes dels NF consten de tres polipèptids diferents amb un domini llarg carboxi-terminal. En mamífers, el triplet d'NF està format per tres tipus de subunitats anomenades lleugera (NFL), mitjana (NFM) i pesada (NFH), de 68, 160 i 200 kDa respectivament. Els NF heteropolimèrics són els més abundants del citoesquelet en neurones grans amb axons mielinitzats, particularment les motores i les sensorials (Lee i Cleveland, 1996). Recentment s'ha proposat que l' α -internexina és un quart component dels NF (Yuan *et al.*, 2006).

L'organització de la xarxa d'NF en els axons es caracteritza per una orientació longitudinal i un espai constant entre filaments amb prolongacions laterals en els dominis de la cua de les subunitats NFM i NFH (Julien i Mushynski, 1998). Els NF actuen com a moduladors del diàmetre axonal dels axons mielinitzats, funció crucial per a determinar la velocitat de conducció (Julien i Mushynski, 1998).

S'han observat alteracions d'NF en diversos processos patològics. Aquestes acumulacions es poden localitzar tant a la part proximal de l'axó com a la distal, així com també en el cos neuronal. S'observen acumulacions d'NF en el pericari neuronal en diverses malalties neurodegeneratives humanes (Clark *et al.*, 1980) i en diversos models experimentals d'intoxicació amb vincristina, colquicina i alumini (Clark *et al.*, 1980; Spencer i Schaumburg, 1983). S'han descrit també acumulacions d'NF a l'axó proximal en pacients amb esclerosi lateral amiotròfica (ELA) i amb atròfia muscular espinal humana (AME) i en gossos amb atròfia muscular espinal canina hereditària (Clark *et al.*, 1980; Perrone-Capano *et al.*, 2001). Tal com s'explica a l'apartat

següent, la intoxicació amb el nitril IDPN provoca també axonopaties proximals als animals (Chou i Hartmann, 1964). Per altra banda les dilatacions axonals multifocals a l'axó distal són un aspecte important en neuropaties associades a l'exposició a hexacarboni, acrilamida i disulfur de carboni i en la neuropatia axonal gegant d'humans i canins (Clark *et al.*, 1980; Spencer i Schaumburg, 1983).

a.3.3 Intoxicació amb IDPN com a model d'axonopatia proximal

Arran dels primers intents d'explicar la síndrome ECC en termes patològics, es van descobrir dilatacions patològiques als axons proximals (fig.18) que contenien acumulació de neurofilaments (Chou i Hartmann, 1964), principalment en neurones motores i sensorials (Chou i Hartmann, 1964; Slagel i Hartmann, 1965) i semblants a les observades en l'ELA (Clark *et al.*, 1980; Perrone-Capano *et al.*, 2001).

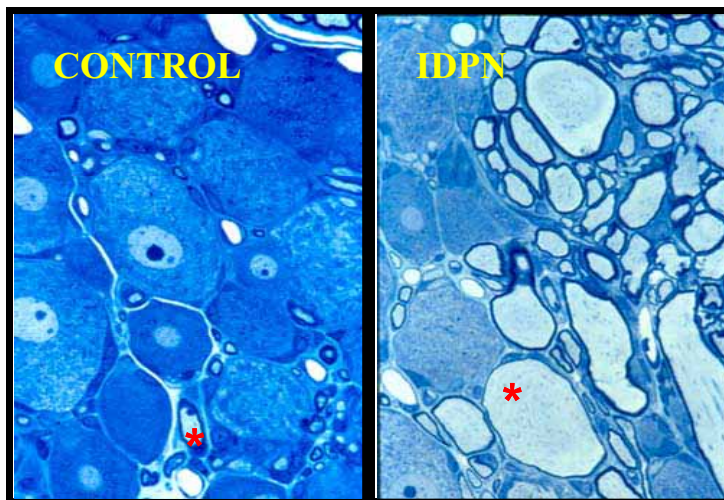


Fig. 18 Axonopatia neurofilamentosa proximal a un gangli de l'arrel dorsal d'una rata tractada amb IDPN. L'asterisc assenyala l'axó de major diàmetre a cada fotografia d'escala idèntica.

Tot i això, tal com s'explica a l'apartat A.2, estudis posteriors han demostrat que l'IDPN provoca degeneració de les cèl·lules ciliades del vestíbul i que aquest efecte explica la síndrome comportamental (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Demêmes, 1994; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001).

a.3.3.1. Estudis del mecanisme d'acció axonopàtica de l'IDPN a la rata

Els NF són els components més estables del citoesquelet i formen una estructura dinàmica que varia de composició i mida al llarg de l'axó. Els tres tipus de subunitats

es sintetitzen al cos neuronal i viatgen al llarg de l'axó. Estudis diversos indiquen que el transport axonal dels NF, conegut com a transport lent "a" per la seva velocitat de 0,3-3mm/dia), resulta del moviment ràpid de $3\mu\text{m/s}$, asincrònic i interromput freqüentment per pauses prolongades, d'oligòmers d'NF que s'intercanvien amb una xarxa d'NF estacionària (Wang *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2000; Brown, 2000). L'equilibri entre el transport dels NF i el seu acoblament pot ser regulat de manera diferent en diverses regions de l'axó i en diferents neurones sota diverses condicions fisiològiques i patològiques (Nixon, 1998).

En els anys 70, els estudis de transport axonal es basaven en una altra hipòtesi que proposava que els NF, després de sintetitzar-se en el pericari de la neurona, es transportaven cap a l'extrem distal de l'axó en forma de massa semisòlida que es mou a 0,2-0,4 mm per dia (Nixon, 1998). En aquest marc conceptual s'estudia l'axonopatia proximal induïda per l'IDPN (Griffin i Price, 1976, 1980; Griffin *et al.*, 1978; Yokoyama *et al.*, 1980; Papasozomenos *et al.*, 1981; Komiya *et al.*, 1986).

Diversos estudis demostren que el transport axonal lent anterògrad de proteïnes està afectat al llarg de tot l'axó per l'IDPN (Yokoyama *et al.*, 1980; Komiya *et al.*, 1986). Els components que es sintetitzen en el cos neuronal i es dirigeixen cap a la terminal nerviosa són les subunitats α y β de la tubulina, que són els principals constituents dels microtúbuls, el polipèptid d'actina que és un component del microfilaments i els tres polipèptids que formen part dels NF. L'exposició a IDPN altera selectivament el transport axonal de neurofilaments al llarg de tot l'axó (Griffin *et al.*, 1978; Yokoyama *et al.*, 1980), mentre que el transport de tubulina i actina no es troba afectat (Yokoyama *et al.*, 1980) o ho està en un grau menor (Griffin *et al.*, 1978), depenent de la pauta d'administració. També s'observa que la síntesi dels NF no està alterada, com tampoc ho estan el sistema de transport axonal anterògrad ràpid ni el retrògrad (Griffin *et al.*, 1978; Yokoyama *et al.*, 1980). Es suggereix que l'axonopatia induïda per IDPN es produeix per una alteració del transport dels NF, quan aquests ja han estat sintetitzats i han passat al segment proximal de l'axó. Aquest procés explicaria la localització proximal de les acumulacions dels NF (Griffin *et al.*, 1978). Es proposen dos mecanismes d'acció de l'IDPN. Un proposa que el tòxic afecta directament sobre alguns elements del transport axonal dels NF, i l'altre que l'IDPN produeix una alteració post-translacional sobre els NF que els deixaria incapacitats per a ser transportats (Griffin *et al.*, 1978; Komiya *et al.*, 1986). En relació amb aquesta segona hipòtesi, s'ha suggerit

que un metabòlit de l'IDPN podria modificar covalentment els NF i provocar la seva incapacitat per a ser transportats (Sayre *et al.*, 1985). Aquestes hipòtesis no s'han pogut confirmar en estudis posteriors i, fins i tot, s'han arribat a posar en dubte quan es van demostrar acumulacions d'NF en el pericari dels ganglis vestibulars, difícils d'explicar amb aquestes hipòtesis (Llorens *et al.*, 1994; Llorens i Demêmes, 1996). Així doncs, a dia d'avui, encara no està aclarit el mecanisme d'acció de l'IDPN en l'axonopatia proximal.

L'estudi realitzat per Papasozomenos *et al.* (1981) mostra com en els nervis motors de rates intoxicades amb IDPN hi ha desplaçament d'NF a la perifèria de la llum axonal així com també de microtúbuls, mitocondris i reticle endoplasmàtic llis cap al centre, i al llarg de tota la longitud axonal. El treball de Griffin *et al.* (1983a) també descriu aquesta desorganització del citoesquelet després d'una injecció directa de l'IDPN a l'axó. És molt destacable el fet que les proteïnes desplaçades cap al centre de l'axó no tenen un transport axonal alterat durant la intoxicació per IDPN. Com a explicació d'aquestes observacions es suggereix que l'IDPN podria alterar la regulació dels ponts d'unió d'NF i microtúbuls (MT) (Papasozomenos *et al.*, 1981). Tot i això, aquesta hipòtesi no ha pogut ser confirmada en treballs posteriors.

Altres estudis sobre l'IDPN es centren en les modificacions post-translacionals dels neurofilaments. Se sap que els neurofilaments poden ser modificats per diverses proteïnes kinases (PK) i per fosfatases que actuen ens els extrems de les subunitats dels NF (Pant i Veerana, 1995). La fosforilació i desfosforilació dels diferents dominis de cada subunitat dels NF regulen la polimerització de les subunitats, el seu transport, les seves interaccions amb altres proteïnes del citoesquelet i la seva degradació, així com la distància entre els filaments intermedis (Kampfl *et al.*, 1996; Nixon, 1998). Normalment, els NF dels axons es presenten extensament fosforilats, mentre que els del pericari neuronal ho estan de forma més escassa (Gold i Austin, 1991). Aquesta heterogeneïtat en la distribució d'NF fosforilats (pNF) està alterada en nombroses patologies humanes i experimentals, incloent la malaltia d'Alzheimer, malalties neuronals motores com l'ELA i l'EMA, l'axotomia i la intoxicació per neurotòxics com l'acrilamida, l'alumini i els organofosforats (Gold i Austin, 1991). En el model d'intoxicació amb IDPN, també s'observa un augment anòmal dels pNF en el pericari de les neurones de la DRG i a les dilatacions axonals de les neurones motores i sensorials (Gold i Austin, 1991).

També s'ha descrit que la fosforilació de les subunitats dels NF, sobretot l'NFH, és significativament més gran en preparacions *in vitro* de rata tractada amb IDPN que en rates control (Eyer *et al.*, 1989). S'observa que un augment dels pNF disminueix el transport axonal d'NF i que la fosforilació del domini de la cua de la subunitat NFH, realitzada per la PK cdc-2, inhibeix les interaccions NF-MT (Hisanaga *et al.*, 1991; Miyasaka *et al.*, 1993). Tot i això, es desconeix encara la implicació directa de la fosforilació aberrant dels NF i les interaccions NF-MT amb la regulació del transport axonal (Watson *et al.*, 1991; Nixon *et al.*, 1994).

Per altra banda, a l'axó perifèric, la cèl·lula de Schwann mielinitzant regula el transport i la acumulació d'NF (De Waeght *et al.*, 1992). Treballs posteriors han corroborat la relació entre els graus de mielinització, la fosforilació dels NF i la mida del segment proximal dels axons en els DRG, en neurones ganglionars de la retina i en els nòduls de Ranvier (Lee i Cleveland, 1996; Nixon, 1998). En els segments poc mielinitzats, els NF es troben menys fosforilats i més pròxims entre si que en els segments mielinitzats dels mateixos axons. Aquests resultats suggereixen que el procés de fosforilació dels NF està relacionat i potser regulat per l'activitat dels oligodendròcits o de les cèl·lules de Schwann que envolten l'axó (Lee i Cleveland, 1996; Nixon, 1998).

En el cas de l'IDPN, s'ha observat que les acumulacions d'NF es generen en el pericari, i no a l'axó, de les neurones del gangli vestibular (Llorens i Demêmes, 1996), neurones que es caracteritzen per presentar el cos neuronal mielinitzat. Aquest fet suggereix l'existència d'una relació entre el mecanisme d'acció de l'IDPN i la regulació del comportament dels NF per la cèl·lula de Schwann (Llorens i Demêmes, 1996).

a.3.3.2. Implicació de l'alteració dels filaments intermedis en la toxicitat vestibular de l'IDPN

Tal com s'ha citat anteriorment, l'IDPN provoca degeneració de les cèl·lules ciliades del vestíbul i aquest efecte explica la síndrome comportamental ECC (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Demêmes, 1994; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001). Seoane *et al.* (2003), després d'haver-se demostrat aquesta relació, van estudiar la possible relació dels FI en la toxicitat vestibular. S'examinà el comportament dels FI de les terminals nervioses de l'epiteli vestibular després d'una exposició a IDPN i s'explorà la possible relació amb la pèrdua de cèl·lules ciliades i amb l'axonopatia proximal. En exposicions aguda, repetitiva i subcrònica, s'observà que

l'IDPN causa pèrdua d'immunoreactivitat anti-neurofilaments, subunitats lleugera, mitjana i pesada (NFL, NFM i NFH respectivament) i anti- α -internexina, en utricles i crestes (fig. 19) (Seoane *et al.* 2003).

Aquests resultats, juntament amb les alteracions ultraestructurals de les terminals nervioses i les CC causades per l'exposició a IDPN (fig. 20), i als estudis anteriors sobre l'efecte axonopàtic, permeten plantejar diferents hipòtesis: (1) les axonopaties neurofilamentoses proximals estan associades a una pèrdua distal d'NF; (2) la pèrdua d'NF en les terminals nervioses es produeix per un alteració de l'equilibri entre el transport axonal i retrògrad d'aquests FI; (3) l'alteració del citoesquelet de les terminals nervioses pot causar la pèrdua de CC o de la funció neuronal. Aquesta última podria ser la causa última de la degeneració neuronal que s'observa en associació amb l'axonopatia neurofilamentosa proximal en l'esclerosi lateral amiotròfica.

a.3.3.3. Acció axonopàtica de l'IDPN en altres espècies

Fins al moment, els treballs realitzats per a estudiar els efectes axonopàtics de l'IDPN han utilitzat principalment la rata com a animal d'experimentació. Tot i això, a la literatura existeixen treballs que indiquen que aquest efecte és estudiable també en el ratolí (Slagel i Hartmann, 1965; Zhu *et al.*, 1998).

Per exemple Slagel i Hartmann (1965), uns dels primers investigadors a descobrir l'efecte axonopàtic de l'IDPN, van estudiar la distribució neuroaxonal de lesions provocades per aquest nitril en el ratolí, i fan referència especialment al sistema vestibular. Van veure lesions axonals molt importants als nuclis vestibulars lateral i medial i en aquell moment van hipotetitzar un possible relació entre aquestes lesions i l'alteració del comportament dels animals administrats: hiperextensió del coll, moviments en cercles i retropulsió. Tot i no poder-se demostrar aquesta relació, el fet demostrable que l'IDPN té efecte axonopàtic en aquesta espècie juntament amb el fet

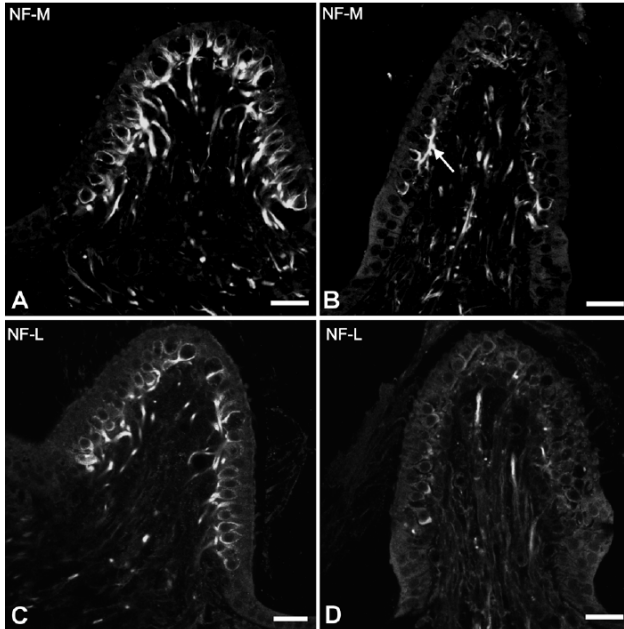
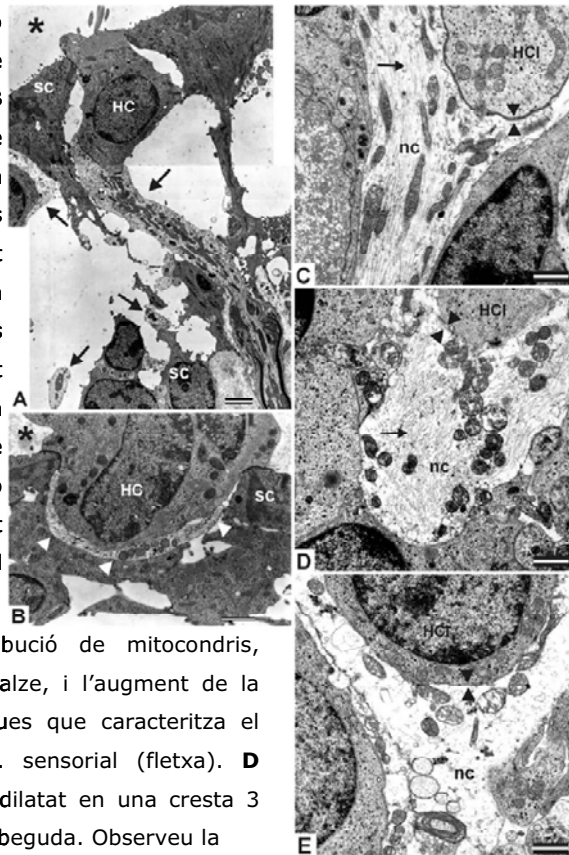


Fig. 19 Seoane *et al.*, 2003. Efecte de l'exposició subcrònica d'IDPN sobre el contingut i distribució d'NF-M (A i B) i NF-L (C i D) a la cresta vestibular de la rata (marcatge immunofluorescent amb anticossos NN18 i NR4 respectivament). **A** Cresta control marcada amb anti-NF-M. **B** Cresta de rata exposada a 0.25% IDPN en aigua de beguda durant 3 setmanes: marcada pèrdua de marcatge d'NF-M. Algunes fibres eferents a la part basal retenen un marcatge intens (fletxa). **C** Cresta control marcada amb anti-NF-L. **D** Cresta de rata exposada a 0.25% IDPN en aigua de beguda durant 3 setmanes marcada amb anticòs NR4: marcada pèrdua de marcatge d'NF-L. Barres 20µm.

Fig. 20 Seoane *et al.*, 2003. Efecte de l'exposició subcrònica d'IDPN sobre les fibres nervioses de l'epiteli vestibular (microscòpia electrònica). **A-B** Supervivència de fibres nervioses després de l'exposició a 0.25% IDPN en aigua de beguda durant 4 setmanes. **A** Presència d'espais extracel·lulars grans i de CC (HC), cèl. de suport (sc) i fibres nervioses (fletxes) sotmeses a separació i retracció dels seus contactes originals. **B** CC sotmesa a l'extrusió a la cavitat luminal (asterisc), mentre una terminal nerviosa del calze (fletxes) es retreu mantenint contacte amb la cèl. **C-E** Efectes primaris de l'exposició subcrònica a IDPN sobre els NF del nervi aferent (nc) i sobre les densitats de membrana del contacte sinàptic entre el calze i la CC de tipus I (HCI). **C** Cresta control. Observeu la distribució de mitocondris, microtúbuls i NF (fletxa) a la part basal del calze, i l'augment de la densitat de les membranes pre i postsinàptiques que caracteritza el contacte entre la terminal nerviosa i la cèl. sensorial (fletxa). **D** Acumulació (fletxa) d'NF en el calze del nervi dilatant en una cresta 3 setmanes d'exposició a IDPN 0.25% en aigua de beguda. Observeu la pèrdua de densitat de les membranes pre i postsinàptiques (fletxes) **E** Un altre calze aferent a la mateixa cresta que a B, mostra absència d'NF així com pèrdua de densitat de les membranes pre i postsinàptiques (fletxes). Escala A 2µm, B 1µm



que existeixen un gran nombre soques de ratolins transgènics, obre la porta a l'avanç en l'estudi del mecanisme d'acció axonopàtic responsable d'aquest efecte.

A.4 Degeneració neuronal per nitrils al sistema nerviós central

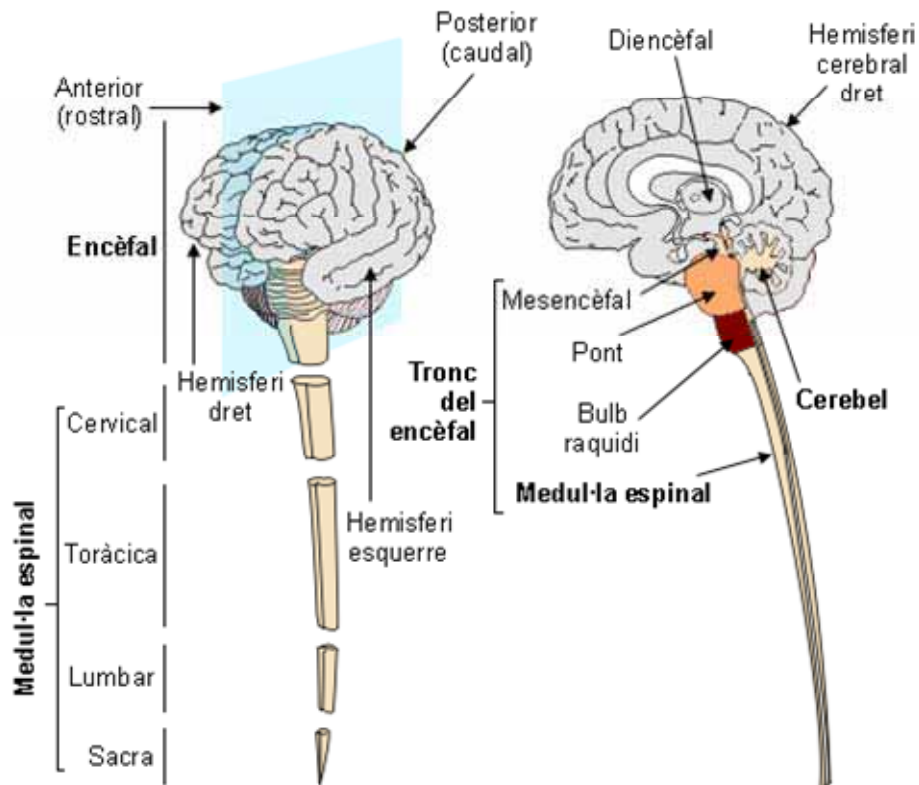


Fig. 21 **A** Representació esquemàtica de l'SNC. **B** Secció sagital de l'SNC, on es representen les subdivisions caudals de l'SNC, que són la medul·la i el tronc de l'encèfal amb les seves tres divisions: el bulb raquidi, la protuberància i el mesencèfal. Mòduls didàctics de la UOC.

a.4.1 Generalitats

Com és sabut, el sistema nerviós central és la part del sistema nerviós que es troba a l'interior de la volta del crani (encèfal) i l'interior del canal vertebral (medul·la). Molts tòxics queden exclosos de l'SNC gràcies a la barrera hematoencefàlica, però tot i això existeixen nitrils que tenen activitat neurodegenerativa a l'SNC. Estem parlant principalment del *trans*-crotononitril (Seoane *et al.*, 2005) i l'hexadienenitril (O'Donoghue, 2000).

a.4.2. Efectes de l'IDPN

Hi ha evidències que l'IDPN pot provocar degeneració axonal a l'SNC, però aquest efecte és poc important i només apareix a dosis molt per sobre de les que es necessiten per provocar toxicitat sensorial (Llorens *et al.*, 1993a). Tot i això, es pot veure publicat en alguns articles que l'IDPN provocaria l'efecte ECC com a conseqüència de toxicitat a l'SNC com a alternativa a la hipòtesi vestibular. Aquests inclouen estudis d'apoptosi (Zang *et al.*, 1999), expressió gènica (Fritschi *et al.*, 2003), sistemes de neurotransmissors (Tanii *et al.*, 2000, Wakata *et al.*, 2000) i radicals lliures (Wakata *et al.*, 2000; Nomoto, 2004).

a.4.3. Efectes del *trans*-crotononitril

El *trans*-crotononitril és un dels dos isòmers del crotononitril o 2-butenenitril ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-CN}$). Tal com ja s'ha comentat, el crotononitril és un nitril que es comercialitza en forma de solució barrejada de dos isòmers, *cis* i *trans*, amb una ratio aproximada de *cis:trans* de 60:40. Aquesta barreja dels dos isòmers, indueix la síndrome ECC en animals d'experimentació de forma similar a l'IDPN (Tanii *et al.*, 1989a, 1991) i toxicitat en el sistema vestibular (Llorens *et al.*, 1993b, 1998).

Estudiant per separat la neurotoxicitat dels dos isòmers obtinguts per destil·lació, s'observa que mostren dos efectes neurotòxics diferenciats. El *cis*-crotononitril provoca degeneració dels sistemes sensorials com en el cas d'altres nitrils (Llorens *et al.*, 1993b; Balbuena i Llorens, 2001) mentre que el *trans*-crotononitril provoca dèficits motors d'activitat vertical (Balbuena i Llorens, 2003).

Estudis recents del nostre laboratori indiquen que aquests dèficits motors provocats pel *trans*-crotononitril són deguts a la degeneració selectiva de les neurones de l'oliva inferior (Seoane *et al.*, 2005). A més de l'oliva inferior, el *trans*-crotononitril causa també una extensa degeneració neuronal a l'escorça piriforme i degeneració d'una petita proporció de neurones a l'escorça entorrinal, al nucli anterodorsal del tàlem i a regions frontals-parietals de l'escorça (Seoane *et al.*, 2005).

El treball de Seoane *et al.* (2005) és el primer estudi anatòmic, fisiològic i comportamental dels efectes neurotòxics del *trans*-crotononitril a la rata. En aquest

estudi es comparen els efectes d'aquest nitril amb els de la 3-acetilpiridina (3AP), considerat fins al moment el compost més efectiu a provocar lesions selectives a l'oliva inferior. Els resultats d'aquest estudi indiquen que els dos neurotòxics efectivament indueixen degeneració neuronal a l'oliva inferior però no tenen cap més diana en comú (taula 3).

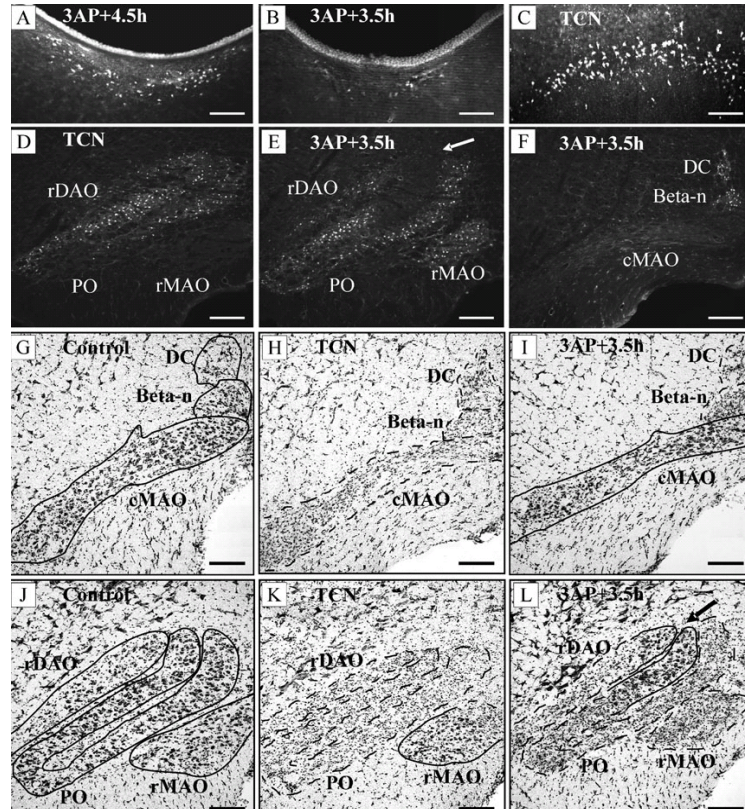
	3AP + 4.5h (n = 3)	3AP + 3.5h (n = 5)	TCN (n = 9)
Oliva inferior	+++	+++	+++
Nucli facial	+	-	-
Nucli Hipoglossal	++	+	-
Nucli dorsal motor del Vague	++	+/-	-
Nucli Ambigu	+++	+	-
Nucli dorsal del Rafe	++	+/-	-
Substància Negra	++	-	-
Àrea tegmental Ventral	+	-	-
Gyrus dentatus, hilus	+	+/-	-
Gyrus dentatus, granular	++	+/-	-
Branca horitzontal de la banda diagonal	+	-	-
Escorça entorrinal medial	+/-	-	-
Escorça entorrinal lateral	+	-	++/-
Escorça Piriforme	-	-	+++
Nucli Talàmic Anterodorsal	-	-	++/-
Escorça Frontal-temporal-parietal	-	-	+/-

Taula 3. Degeneració neuronal en rates exposades a 3AP i TCN. Intensitat del marcatge Fluoro-Jade B de neurones en degeneració a SNC després dels tractaments amb TCN i amb 3AP per un temps d'actuació de 4.5 h (3AP + 4.5 h) o de 3.5 h (3AP + 3.5 h) fins a l'administració de nicotinamida com a antídote. Indicació no quantitativa obtinguda mitjançant la comparació del marcatge obtingut i les estructures corresponents en un cervell normal (obtingudes de l'atles Paxinos i Watson 1998). -, no evidència de marcatge; +, mínima evidència de marcatge (no més d'un 1 o 2% de les cèl·lules mostren marcatge a la zona); ++, evidència moderada de marcatge (entre 2 i 30% de cèl. marcades); +++, evidència massiva (més d'un 30% de marcatge).

Els resultats de Seoane *et al.* (2005) indiquen que el *trans*-crotononitril i la 3AP produeixen lesions específiques de les regions de l'oliva inferior a diferents mòduls cerebel·lars i que les diferències observades en els dèficits comportamentals que provoquen permeten hipotetitzar que els diferents mòduls tenen diferents responsabilitats en el control motor.

Fig. 22 Seoane *et al.* (2005).

Degeneració neuronal i supervivència cel·lular a l'SNC de rates administrades amb 3AP+4.5h, 3AP+3.5h i TCN. **A-F** Degeneració neuronal identificada amb la tinció Fluoro-Jade B. **A** Nucli dorsal del rafe 3 dies després de 3AP+4.5h. **B** Nucli dorsal del rafe 3 dies després de 3AP+3.5h. **C** Escorça piriforme 3 dies després de TCN. Nombroses neurones marcades a la capa II i un petit nombre a les capes I i III. **D** Part rostral de l'OI 12 dies després de TCN. Marcatge present a rDAO i PO i absència de marcatge a rMAO. **E** Part rostral 12 dies després de 3AP+3.5h. Marcatge present a rMAO, PO i parts laterals de l'rDAO i absència



de marcatge entre rDAO medial i dorsal (fletxa). **F** Part caudal de l'OI 12 dies després de 3AP+3.5h. Marcatge de neurones a DC i al subnucli beta però absència de marcatge al cMAO. **G-L** Parts amb cèl. supervivents marcades amb Cresil de Violeta. **G** i **J** Parts caudal i rostral de l'OI a rata control. Les subdivisions olivars estan delimitades amb una línia contínua. **H** i **K** Igual que G i J però en una rata tractada amb TCN (12 dies després del tractament). Les regions olivars on hi ha una important pèrdua de neurones estan delimitades amb una línia discontinua, mentre que les supervivents ho estan amb una línia contínua. **I** i **L** Igual que H i K però corresponent a una rata tractada amb 3AP+3.5h (12 dies després del tractament). Hi ha cèl. supervivents a la regió cMAO i a la transició entre rDAO i PO (fletxa a L). Escala 100µm

D'aquesta manera, aquest estudi introdueix un nou agent neurotòxic, el *trans*-crotononitril, que pot ser utilitzat per a estudiar el paper dels diferents mòduls cel·lulars de l'oliva inferior: cMAO (subdivisió caudal del nucli accessori medial de l'oliva), Beta-n (nucli beta), cDAO (subdivisió caudal del nucli accessori dorsal de l'oliva), rMAO (subdivisió rostral del nucli accessori medial de l'oliva), PO (oliva principal) i rDAO (subdivisió rostral del nucli accessori dorsal de l'oliva) (fig. 22). Des de fa anys s'hipotetitzava que els grups cel·lulars de l'oliva inferior tenien un paper central en la regulació dels moviments (Simpson *et al.* 1996; De Zeeuw *et al.* 1998), però a causa, en part, de la falta d'ús de tècniques adequades, fins al moment de publicar-se aquest estudi hi havia molt poca informació de les funcions dels diferents mòduls cerebel·lars en el control motor.

a.4.4. Efectes de l'hexadienenitril

L'hexadienenitril (2,4-hexadien-1-nitril) havia estat utilitzat com a intermediari de la síntesi de productes químics però des de l'any 1983 ja no s'utilitza.

L'única informació toxicològica disponible sobre l'hexadienenitril és una nota curta (O'Donoghue, 2000) que explica la detecció de degeneració neuronal a l'oliva inferior a rates exposades a aquest nitril. Aquesta evidència suggereix que podria tenir un patró de neurotoxicitat semblant al del *trans*-crotononitril.

A.5. Resum dels efectes neuro tòxics de l'IDPN, del *cis*-crotononitril, del *trans*-crotononitril i de l'hexadienenitril a la rata i el ratolí

	TCN		CCN		ALN		IDPN		HDN	
	Rata	Ratolí	Rata	Ratolí	Rata	Ratolí	Rata	Ratolí	Rata	Ratolí
SNC										
Degeneració neuronal	Sí ⁽¹⁾	?	?	?	?	?	?	?	Sí ⁽⁶⁾	?
SNP										
Axonopatia	?	?	?	?	?	?	Sí ⁽²⁾	Sí ⁽⁹⁾	?	?
Sist. SENSORIALS										
Tox. Olfactiva	No ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁴⁾	?	Sí ⁽⁷⁾	?	?	?
Tox. Visual	No ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁴⁾	?	Sí ⁽⁸⁾	?	?	?
Tox. Vestibular	No ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁴⁾	?	Sí ⁽²⁾	?	?	?
Tox. Auditiva	No ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁵⁾	?	Sí ⁽⁴⁾	?	Sí ⁽³⁾	?	?	?

Taula 4. Resum general dels efectes dels nitrils a l'SNC, a l'SNP i als sistemes sensorials de la rata i el ratolí. Els números en superíndex indiquen la font d'informació de procedència: ¹Seoane *et al.*, 2005; ²Llorens *et al.*, 1993; ³Crofton *et al.*, 1994; ⁴Balbuena and Llorens, 2001; ⁵Balbuena and Llorens, 2003; ⁶O'Donoghue, 2000; ⁷Genter *et al.*, 1996; ⁸Seoane *et al.*, 1999; ⁹Chou i Hartmann, 1964.

La taula 4 té la finalitat de resumir els efectes dels nitrils a la rata i el ratolí, explicats de forma detallada en els apartats anteriors. Com es pot observar, la taula mostra múltiples interrogants. Aquesta tesi intentarà donar resposta a diversos d'aquests interrogants a partir dels resultats obtinguts en l'estudi exhaustiu del sistema nerviós central mitjançant la tinció Fluoro-Jade B, de l'orella interna mitjançant microscòpia electrònica de rastreig i amb la relació de les lesions que es descriguin amb les alteracions del comportament espontani *in vivo*.

B. Metabolisme dels nitrils

B.1. Introducció

Tenint en compte tots els efectes descrits fins al moment, es pot concloure que la neurotoxicitat dels nitrils presenta una complexitat important. Hi ha indicis que assenyalen que el metabolisme podria tenir un paper de bioactivació necessari perquè les accions neurotòxiques fossin efectives, però encara no ha estat identificat cap metabòlit causant de la neurotoxicitat dels nitrils exposats en aquest treball.

En el cas de l'IDPN, tot i conèixer-se des de fa anys la seva acció neurotòxica, a hores d'ara encara no s'ha pogut identificar el compost final que provoca tal efecte, el qual podria desencadenar-se per la pròpia molècula d'IDPN o per un metabòlit resultant. Per intentar aclarir aquesta qüestió s'han realitzat diversos estudis en què s'aïllaren metabòlits de l'orina de rates tractades amb IDPN: β -aminopropionitril (BAPN), àcid cianoacètic i β -alanina (Morandi *et al.*, 1987). Amb el coneixement d'aquets metabòlits i de les rutes metabòliques que segueixen les amines secundàries, es proposaren diverses vies de metabolisme de l'IDPN (fig.23) (Morandi *et al.*, 1987; Engelhart, 1994).

Una de les opcions planteja una β -C-hidroxilació mitjançant el citocrom P450 que forma una carbinolamina inestable (2 a la fig. 23) que es dissociaria en BAPN i àcid cianoacètic (Jacobson *et al.*, 1987). Aquesta carbinolamina podria també deshidratar-se i formar el compost insaturat dihidro-IDPN (3) (Jacobson *et al.*, 1987). Aquest últim (3) podria ser també generat per tautomerització de la imina (4) que apareixeria per deshidratació de l'IDPN mitjançant la monoamina oxidasa (MAO) (Morandi *et al.*, 1987). Finalment, la via metabòlica més comuna de les amines secundàries és l'N-hidroxilació per la flavin monooxigenasa (FMA) (Morandi *et al.*, 1987). En el cas de l'IDPN, aquesta via donaria com a resultat l'N-hidroxi-IDPN (HOIDPN) (5). Per conjugació (6) podria tautameritzar-se i donar la imina (4) que podria formar β -alanina i àcid cianoacètic (Jacobson *et al.*, 1987; Morandi *et al.*, 1987).

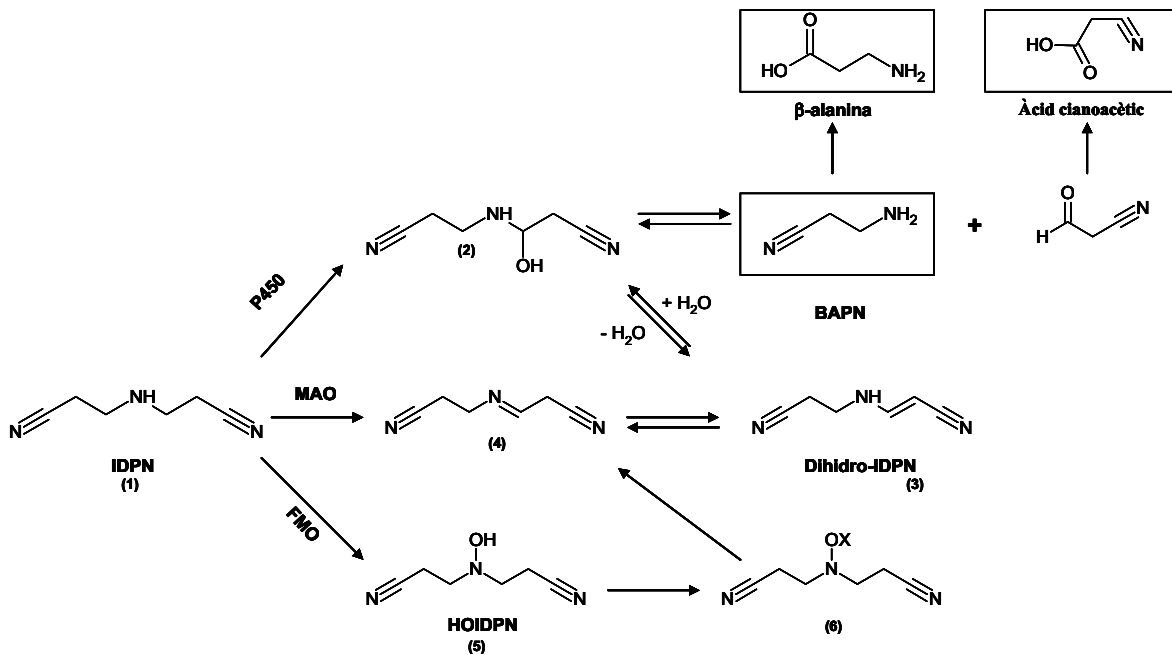


Fig. 23 Possibles vies metabòliques de l'IDPN. Esquema d'Engelhart (1994). Els compostos dins els requadres són metabòlits de l'IDPN detectats a l'orina de rates administrades amb aquest nitril.

Algunes d'aquestes vies proposades han estat objecte d'estudi en diversos treballs, però com ja s'ha comentat, a dia d'avui encara no s'ha pogut proposar cap mecanisme metabòlic clar i reproduïble per l'IDPN en el laboratori.

B.2. Mediació del metabolisme hepàtic en la toxicitat dels nitrils

b.2.1. Introducció

Ohkawa i col·laboradors (1972) proposaren la hipòtesi que mitjançant la hidroxilació del carboni alfa d'alguns nitrils via citocrom P450 es formaria una cianohidrina intermèdia poc estable que es descompondria ràpidament en cianur i el corresponent compost carboxílic (fig.24). Estudis posteriors amb animals d'experimentació han corroborat aquesta hipòtesi (Silver *et al.*, 1982; Ahmed i Farooqui, 1982; Tani i Hashimoto, 1984, 1985). La facilitat d'alliberament de cianur mitjançant el metabolisme del citocrom P450 està determinada per l'estabilitat del radical del carboni alfa. La toxicitat aguda és major com més estable sigui aquest radical (De Vito, 1996).

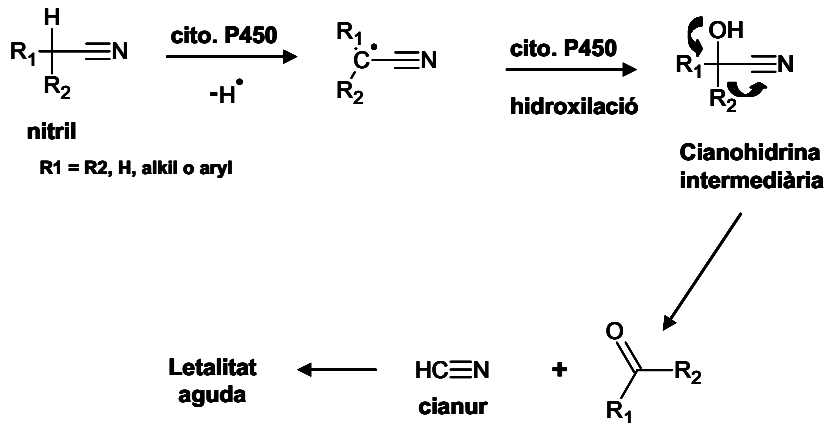


Fig. 24 Cianogènesi metabòlica dels nitrils. Esquema adaptat de De Vito (1996). Mitjançant el citocrom P450 s'hidroxilen en el carboni alfa i es forma una cianohidrina que es descompon en cianur i el seu corresponent compost carboxílic.

D'entre les nombroses isoformes del P450 existents (González, 1989), a dia d'avui encara no s'ha pogut determinar quines d'elles són les responsables reals de la metabolització dels diferents nitrils. Tot i això, una de les isoformes que sembla tenir un paper clau és la 2E1, és a dir, el citocrom P4502E1 (CYP2E1) (Tanii *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 1994).

b.2.2. El citocrom P4502E1 (CYP2E1)

El citocrom P4502E1, el gen del qual és induïble per etanol i acetona, va ser identificat primerament en conills (Koop, DR. *et al.* 1984; Koop, DR. *et al.*, 1982) i més tard en rates (Patten, CJ. *et al.*, 1986; Ryan, DE., *et al.*, 1985) i humans (Wrighton, SA., *et al.*, 1986; Wrighton, SA., *et al.*, 1987). Aquest enzim té capacitat de metabolitzar diversos substrats com l'etanol (Koop, DR. *et al.*, 1982), el dietil èter (Brady, JF. *et al.* 1988), el p-nitrofenol (Koop, DR. *et al.*, 1986), l'halotà (Gruenke, L. *et al.* 1988), el benzè (Johansson, I. *et al.*, 1988), la piridina (Kim, SG. *et al.*, 1988) i la nitrosodimetilamina (Hood L. *et al.*, 1975; Patten, CJ. *et al.*, 1986; Thomas, PE. *et al.* 1987 Wrighton, SA., *et al.*, 1986). A més, aquesta activitat cap a acetona i acetoloxidació suggereix que el CYP2E1 està implicat en la gluconeogènesi durant el dejuni (Casazza, JP. *et al.* 1984). El cDNA d'aquest enzim ha estat aïllat i seqüenciat a la rata (Song, BJ. *et al.*, 1987), humans (Song, BJ. *et al.*, 1987) i conills (Khani, SC. *et al.*, 1987), i s'ha vist que les seqüències són similars en un 80%.

b.2.3. El citocrom P4502E1 en el metabolisme dels nitrils

El fet demostrat per Tanii *et al.* (1986) que l'etanol augmentava la toxicitat aguda dels nitrils suggerí que el citocrom P4502E1 podia estar-hi implicat, ja que és sabut que

l'etanol induïx l'expressió del gen d'aquest citocrom. De fet, anys més tard, Lewis *et al.* (1994) van estudiar la interacció d'una sèrie de nitrils amb l'isoforma del P450 induïble per etanol i van poder demostrar que era aquesta isoforma induïble per etanol la possible responsable de la metabolització de certs nitrils i el posterior alliberament de cianur.

b.2.3.1. El citocrom P4502E1 en el metabolisme de l'IDPN

Pel que fa l'IDPN, Jacobson *et al.* (1987), sense especificar la isoforma 2E1, ja havien hipotetitzat que l'IDPN podria ser bioactivat pel P450. Tot i això, aquesta hipòtesi es va posar en dubte en diversos treballs. Un d'ells mostrava que el pretractament amb tetraclorur de carboni (CCl₄), un hepatotòxic que causa una marcada pèrdua de la funció hepàtica, augmentava la toxicitat de l'IDPN (Llorens i Crofton, 1991), i això suggereix que el metabolisme mitjançat pel citocrom P450 podria ser més aviat un sistema de destoxicació de l'IDPN. Un altre estudi demostrava que la metirapona, un potent inhibidor de l'N-dealquilació oxidativa de l'IDPN (que donaria BAPN) mitjançada pel P450 hepàtic *in vitro* (Engelhart, 1994), no tenia cap efecte sobre la neurotoxicitat de l'IDPN *in vivo* (Engelhart, 1994). Finalment, la deuteració de la posició 3 de l'IDPN, que relenteix el seu metabolisme per aquesta posició, produeix un augment de la seva neurotoxicitat i una menor excreció de l'àcid cianoacètic urinari (Delinger *et al.*, 1992, 1994). Per altra banda, però, tots aquests estudis contrasten amb el de Genter *et al.* (1994a) que suggeria que l'isoforma P4502E1 de la mucosa olfactiva era necessària per a la bioactivació de l'IDPN. En els seus estudis s'observava un increment de la toxicitat olfactiva amb la inhibició del citocrom P4502E1 olfactivu mitjançant metirapona o CCl₄. Aquesta discrepància suggereix que el mecanisme d'acció de l'IDPN responsable de la seva toxicitat olfactiva podria ser diferent al que produeix la síndrome ECC i l'axonopatia neurofilamentosa.

b.2.3.2. El citocrom P4502E1 en el metabolisme d'altres nitrils

L'acetona, produïda en condicions de dejuni o diabetis, és inductora i substrat del CYP2E1 (Koop DR *et al.*, 1992; Yang CS *et al.*, 1990) i des de fa anys ha estat utilitzada per a l'estudi del metabolisme de la glucosa en mamífers (Borek E *et al.*, 1949; Price TD *et al.* 1950). Ha estat demostrat que *in vitro* el CYP2E1 catalitza la conversió de l'acetona a acetol i després a metilglioxal, tots intermediaris de la

gluconeogènesi (Casazza JP *et al.*, 1984; Casazza *et al.*, 1985; Koop DR *et al.*, 1985). En rates i humans, l'administració de disulfiram, un potent inhibidor del CYP2E1, causa un increment significatiu d'acetona en sang (Stowell A *et al.*, 1983; DeMaster EG *et al.*, 1977) i en rates administrades amb dial·lilsulfur, un altre potent inhibidor pel CYP2E1, s'ha pogut veure també aquest increment en sang fet que s'atribueix a la davallada del catabolisme de l'acetona (Chen L *et al.*, 1994).

Tot i que la importància del CYP2E1 en el catabolisme de l'acetona ha estat molt estudiada *in vivo* utilitzant inhibidors d'aquest enzim com el disulfiram i el dial·lilsulfur, l'especificitat d'aquests inhibidors no està encara del tot demostrada. Per solucionar aquests dubtes, Bondoc *et al.* (1999) estudiaren el catabolisme de l'acetona *in vivo* utilitzant ratolins *knock-out* pel CYP2E1, soca creada per Frank J. Gonzalez (NIH, Bethesda) (Lee *et al.*, 1996). En aquest estudi *in vivo*, es mesuraren les concentracions d'acetona en sang d'aquests ratolins CYP2E1^{-/-} després d'estar en dejuni durant 48h i es compararen a les mateixes condicions amb les concentracions de dues soques anomenades C57BL/6N i 129/Sv, les quals tenien el gen CYP2E1 intacte i formaven part del llinatge parental de la soca CYP2E1^{-/-}. Es demostrà clarament que el CYP2E1 té un paper clau *in vivo* en la catabolització de l'acetona sota condicions de dejuni (taula 5)

Tractament	Acetona en sang (µg/ml)		
	CYP2E1 ^{-/-}	C57BL/6N	129/Sv
Control	3.3 ± 0.9	2.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3
Dejuni	92.3 ± 41.6*	5.7 ± 1.8	15.4 ± 1.9

Taula 5. Taula adaptada de Bondoc *et al.* (1999). Efecte del dejuni en la concentració d'acetona en sang de ratolins CYP2E1^{-/-} i les seves soques del llinatge parental. Valors mediana ± SD (N = 3-5). * Diferències significatives de tots els grups control i dels grups C57BL/6N i 129/Sv dejuni.

Sumner *et al.* (1999) utilitzaren la soca CYP2E1^{-/-} per estudiar el paper del CYP2E1 en el metabolisme de l'acrilonitril, un anàleg del crotononitril. En aquest estudi determinaren els metabòlits en orina resultants de l'administració d'acrilonitril, tant en ratolins salvatges com en CYP2E1^{-/-} i deduïren que el CYP2E1 era l'únic citocrom P450 involucrat en el metabolisme oxidatiu de l'acrilonitril ja que en l'orina d'aquests no es trobaren metabòlits resultants de la via oxidativa. De fet semblava ser que l'acrilonitril es podria conjuguar directament amb el glutatió (GSH) i podria també ser epoxidat pels citocroms P450 a la vegada que la conjugació amb glutatió podria conduir a una ràpida

depleció d'aquest en els teixits (Farooqui *et al.*, 1983; Ghanayem *et al.*, 1985; Benz *et al.*, 1997; Nerland *et al.*, 2001). Aquest fet va ser finalment corroborat per Wang *et al.* (2002) que demostrà definitivament que l'oxidació de l'acrilonitril per part del CYP2E1 és un prerequisite per a la producció de cianur a partir d'aquest nitril i que el CYP2E1 seria l'únic enzim responsable de la formació del CEO (fig. 25) que portaria a la formació del cianur. A més, es demostrà definitivament que la inactivació del CYP2E1 és un mecanisme molt eficient per inhibir la formació de cianur *in vivo* a partir d'acrilonitril.

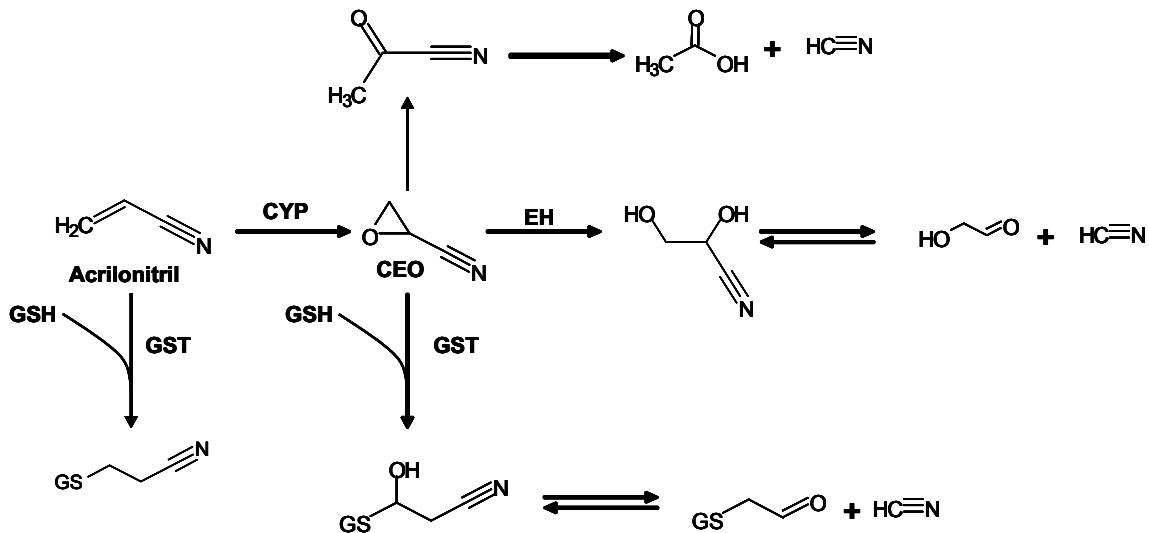


Fig. 25 Esquema adaptat de Wang *et al.* (2002) i Sumner *et al.* (1999). Proposta de la funció del citocrom P450 (CYP) i de l'epòxid hidrolasa (EH) en el metabolisme de l'acrilonitril. (GSH=glutatió; GST= glutatió-S-transferasa)

Avançant en la via metabòlica, El Hadri *et al.* (2005) estudiaren també el paper de l'epòxid hidrolasa en el metabolisme de l'acrilonitril i també del metacrilonitril usant ratolins CYP2E1 -/- i ratolins *knock-out* per l'epòxid hidrolasa microsomal (mEH -/-). En aquest treball, a part de corroborar-se que el CYP2E1 era l'únic responsable de la formació de cianur a partir d'acrilonitril, deixava clar que el cianur era el responsable de la letalitat d'aquest nitril i que a més l'mEH tenia també un paper important en la formació de cianur. En general doncs, sembla clar que tant el CYP2E1 com l'mEH podrien tenir un paper important en el metabolisme dels nitrils alifàtics de cadena curta, sobretot pel que fa a la formació de cianur

b.2.3.3. Possibles vies metabòliques pel *cis*-crotononitril i l'al·lilnitril

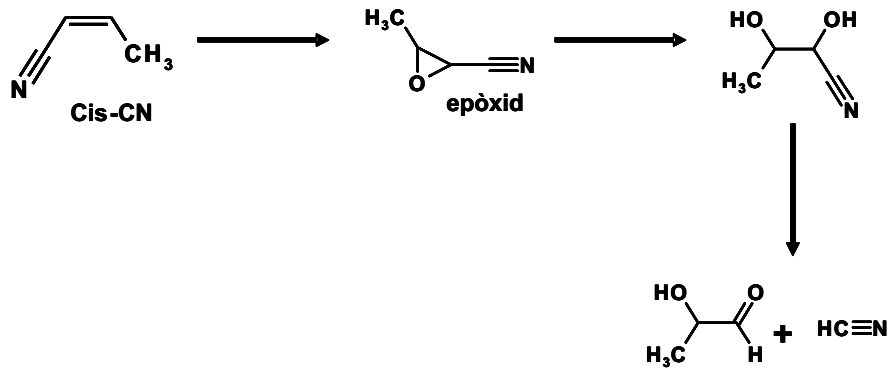


Fig. 26 Esquema de la hipòtesi proposada pel metabolisme del *cis*-crotononitril

El *cis*-crotononitril és un compost similar a l'acrilonitril en el fet que els dos compostos tenen una insaturació en posició alfa-beta, i aquest fet permet hipotetitzar que el *cis*-crotononitril podria generar també un epòxid via CYP2E1 tal com ho fa l'acrilonitril (Sumner *et al.*, 1999) (fig. 26). Una de les hipòtesis d'aquest treball de tesi és que la metabolització per CYP2E1 és important per a la neurotoxicitat d'aquest nitril, hipòtesi que s'estudia utilitzant les soques CYP2E1^{-/-} i WT 129S1 de ratolí.

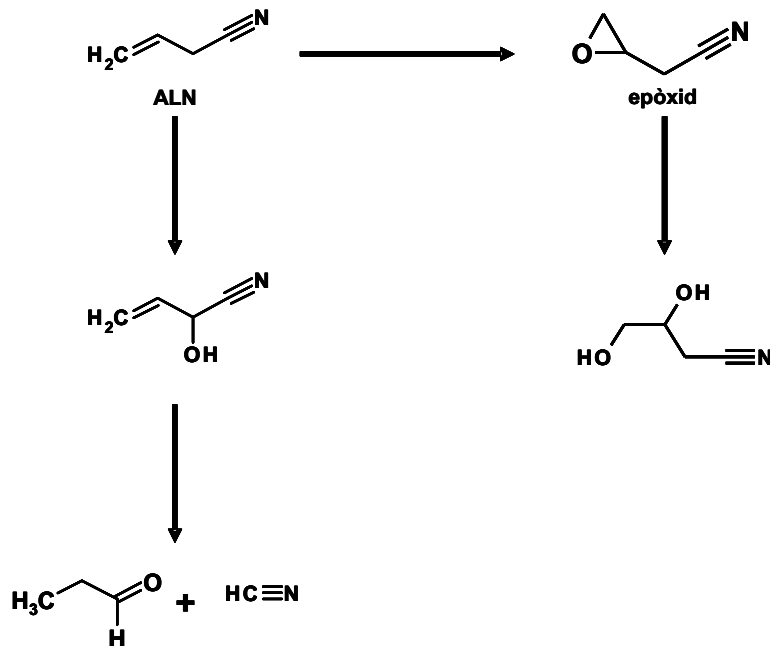


Fig. 27 Esquema de la hipòtesi proposada pel metabolisme de l'al·lilnitril

Per altra banda, en el nostre grup també estem estudiant actualment el paper del metabolisme en la neurotoxicitat de l'al·lilnitril. Aquest nitril és una molècula β,γ -insaturada, similar al *cis*-crotonnitril i l'acrilnitril, i es suggereix que podria generar-se cianur per una hidroxilació del carboni α mitjançant el CYP2E1 (Ohkawa *et al.*, 1972; Silver *et al.*, 1982) (fig. 27). Per altra banda, però, hi podria haver un epoxidació del doble enllaç, fet que podria no conduir necessàriament a la generació de cianur (Silver *et al.*, 1982) (fig. 27). Per tal d'estudiar el paper del CYP2E1 en el metabolisme de l'al·lilnitril s'han utilitzat, igual que en el cas de l'estudi del *cis*-crotonnitril, soques CYP2E1^{-/-} i la WT 129S1 de ratolí.

C. Tècniques d'avaluació de la neurotoxicitat

C.1 Introducció

La neurotoxicologia estudia els efectes adversos en l'estructura o funció del sistema nerviós central i perifèric produït per un agent biològic, químic o físic (Tilson, 1990). No només es qüestiona la detecció i identificació de l'agent neurotòxic sinó també el seu coneixement més profund. Entre els principals objectius d'aquesta ciència es troba el de determinar i quantificar els efectes associats a un rang ampli de dosis, establir relacions dosi-efecte i temps-efecte, explorar l'existència d'efectes de toxicitat crònica, retardat i/o latent, i conèixer el mecanisme d'acció. Tota aquesta informació, a més de permetre una valoració del risc associat a l'exposició de la substància i un desenvolupament de mètodes de detecció precoç de malalties neurotòxiques, de sistemes de prevenció i/o tractament i d'alternatives menys neurotòxiques i igualment útils, permet avançar en els mecanismes bàsics de la fisiologia dels sistema nerviós.

L'avaluació de la neurotoxicitat es realitza mitjançant estudis histològics, de biologia molecular, comportamentals, electrofisiològics i de biomarcadors (Tilson, 1990, 2000). En aquest treball es destaca la utilització de tècniques histològiques mitjançant la tinció amb Fluoro-Jade i microscòpia de rastreig, tècniques comportamentals i tècniques quimicoanalítiques.

C.2 Tècniques histològiques

Donada la complexitat del sistema nerviós i la diversitat de tipus cel·lulars, determinar la manca de neurones que inicialment eren poc abundants pot ser molt difícil. Així, en neurotoxicologia, és especialment interessant disposar de tincions amb capacitat de revelar neurones en degeneració.

Durant molts anys, les tècniques utilitzades amb aquesta finalitat han estat les diverses variants de tinció de plata (Gallyas *et al.*, 1980; De Olmos *et al.*, 1994) derivades del mètode de Cajal-Golgi i introduïdes inicialment per a la determinació de degeneració neuronal per Nauta (vegeu revisions Balaban, 1992 i Switzer, 2000).

Aquestes tècniques tenen, però, el gran inconvenient de requerir molt de temps i esforç. En els últims anys ha aparegut una alternativa molt senzilla: El Fluoro-Jade, un derivat aniònic de la fluoresceïna que tenyeix neurones en degeneració (Schmued *et al.*, 1997) i no tenyeix neurones sanes, mielina, elements vasculars excepte les cèl·lules de les meninges i el plexe coroïdal. Les cèl·lules en degeneració apareixen de color verd brillant en un fons verd fosc. Encara ara, però, es desconeix el mecanisme exacte pel qual el Fluoro-Jade tenyeix neurones en degeneració.

Recentment s'ha desenvolupat un derivat del Fluoro-Jade: el Fluoro-Jade B, que manté els avantatges del primer, però té major resolució i contrast (Schmued i Hopkins, 2000a, b). Aquesta és la principal tècnica utilitzada per a la detecció de neurones en degeneració en aquest treball.

Per a la determinació de degeneració de cèl·lules ciliades als epitelis sensorials auditiu i vestibular és de gran utilitat la microscòpia electrònica de rastreig (Llorens *et al.*, 1993; Balbuena i Llorens, 2001-2003).

C.3 Tècniques comportamentals

Qualsevol canvi causat per un agent neurotòxic en alguna de les funcions sensorials, motores, sensori-motors o cognitives de l'individu afectarà la seva relació amb l'entorn. Aquesta relació, que revela el funcionament integrat del sistema nerviós pot ser avaluat mitjançant tests comportamentals (Tilson i Mitchell, 1984). En

neurotoxicologia humana, el comportament es pot avaluar mitjançant la informació subjectiva relacionada per l'individu. En canvi, en els estudis amb animals, el disseny dels tests comportamentals és molt més complex.

Treballs previs en aquest laboratori han desenvolupat tècniques comportamentals per avaluar el nivell de degeneració vestibular de la rata (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997). Aquestes tècniques consisteixen en una bateria de tests semiquantitatius que avaluen el comportament espontani i reflexos, que combinats conjuntament donen com a resultat una bona indicació de l'estat funcional del vestíbul de la rata. (Balbuena i Llorens, 2001, 2003).

Per tal d'avaluar la degeneració neuronal de l'oliva inferior a rates exposades a *trans*-crotononitril, s'ha desenvolupat un nou test: l'Escala vertical que mesura la capacitat dels animals a mantenir-se en una superfície vertical. També s'ha utilitzat l'anàlisi del patró de la marxa a partir de les empremtes de l'animal, amb les quals s'avaluen la llargada i l'amplada de pas com a paràmetres comparables entre grups d'animals (Parker i Clarke, 1990; Seoane *et al.*, 2005).

C.4 Tècniques quimicoanalítiques

Com s'ha pogut anar veient al llarg de la introducció d'aquesta tesi, el metabolisme sembla jugar un paper important en la neurotoxicitat dels nitrils. D'aquesta manera és de gran interès poder utilitzar tècniques de determinació de metabòlits presents en animals administrats amb agents neurotòxics.

En el cas concret dels nitrils, ha estat important l'ús d'aquestes tècniques per a determinar el cianur i/o els seus derivats, tant en sang com en orina. La tècnica més utilitzada per a aquest fet era la de microdifusió en cambres de Conway combinada amb mètodes de determinació colorimètrica (Conway, 1962; El Hadri *et al.*, 2005), fluoromètrica (Sano *et al.*, 1989) o electromètrica (Lindsay *et al.*, 2004). Més recentment s'han utilitzat altres tècniques com la HPLC acoblada a una detecció fluoromètrica (Chinaka *et al.*, 1998) o electroforesi capil·lar acoblada a un detector de UV (Jermak *et al.* 2006).

L'ús de la cromatografia de gasos per a la separació de metabòlits també ha estat de gran importància, i el fet de poder-hi acoblar un detector de nitrogen-fòsfor la fa encara més interessant per a determinar metabòlits provinents dels nitrils. En aquesta tesi, davant la necessitat de determinar nitrils i cianur en sang de forma simultània, s'ha optimitzat una metodologia que combina l'SPME (*Solid Phase Microextraction*), una tècnica amb la qual podem adsorbir les molècules volàtils petites d'una mostra en agitació, amb una cromatografia de gasos amb detector nitrogen-fòsfor (GC-NPD).

II
OBJECTIUS

Objectius

L'**objectiu general** del grup de recerca és contribuir a l'avanç del coneixement de la neurotoxicitat dels nitrils per la seva importància industrial, per la seva presència en els aliments i pel seu possible paper en algunes malalties neurològiques humanes. Amb aquest fi, es perseguirà la identificació dels patrons de neurotoxicitat selectiva dels nitrils i dels requeriments estructurals de les molècules responsables de la toxicitat.

Els **objectius concrets** per a aquest treball de tesi són:

- 1.** Identificar les dianes del 3,3'-iminodipropionitril (IDPN), l'al·lilnitril, el *cis*-crotononitril, el *trans*-crotononitril i el 2,4-hexadienenitril al sistema nerviós de la rata i establir la relació entre les lesions estructurals i els efectes comportamentals que aquests provoquen.
- 2.** Estandarditzar tests comportamentals per a l'avaluació dels efectes tòxics sobre el comportament espontani de ratolins administrats amb IDPN, al·lilnitril i *cis*-crotononitril, com a condició prèvia a l'ús de soques de ratolins transgènics per a l'estudi de la toxicitat vestibular d'aquests nitrils.
- 3.** Desenvolupar una protocol quimicoanalític per a la determinació simultània de cianur i nitrils volàtils mitjançant microextracció en fase sòlida (SPME) i cromatografia de gasos amb detector nitrogen-fòsfor (GC-NPD), aplicable a l'anàlisi de sang d'animals administrats amb al·lilnitril, *cis*-crotononitril, *trans*-crotononitril o butironitril.
- 4.** Avaluar la hipòtesi segons la qual el metabolisme del *cis*-crotononitril pel citocrom P4502E1 (CYP2E1) té un paper de bioactivació en la toxicitat vestibular d'aquest nitril, mitjançant l'ús d'una soca de ratolins *knock-out* per aquest enzim.
- 5.** Avaluar el paper del metabolisme de l'al·lilnitril pel P4502E1 (CYP2E1) en la inducció dels efectes vestibulotòxics o letals d'aquest nitril, mitjançant l'ús d'una soca de ratolins *knock-out* per aquest enzim.

III
RESULTATS

Capítol 1

Classificació dels nitrils segons els seus efectes histopatològics i comportamentals a la rata

Article 1*

«Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles».

BOADAS-VAELLO, Pere; RIERA, Judith; LLORENS, Jordi.
Toxicological Sciences, 2005, núm. 88, pàg. 456-466.

*Es pot consultar l'article original al web <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/88/2/456>.
Per a més informació: jllorens@ub.edu

Resum article 1: «Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles». BOADAS-VAELLO, Pere; RIERA, Judith; LLORENS, Jordi. *Toxicol. Sci.*, 2005, núm. 88, pàg. 456-466.

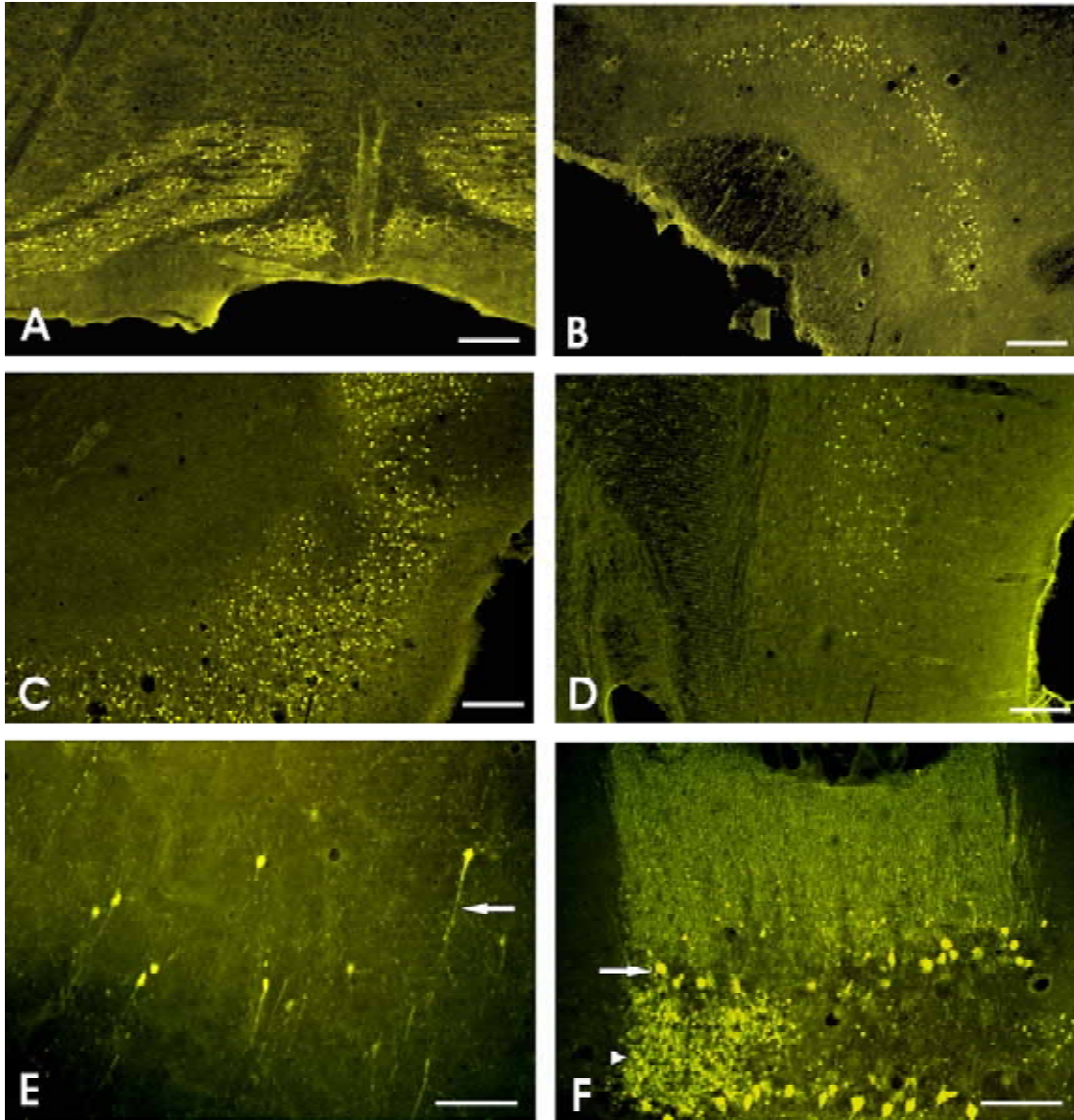


Fig.28 Degeneració neuronal al sistema nerviós central de rates exposades a hexadienenitril, en seccions coronals (50 μ m) tenyides amb Fluoro-Jade B. **A** Oliva inferior; s'observa la degeneració selectiva de neurones olivars. **B** Escorça piriforme; s'observa degeneració neuronal principalment a la capa II, però també degeneren algunes neurones a les capes I i III. **C** Escorça entorinal lateral; s'observa una extensa lesió a les capes II a V. **D** Escorça cingulada. **E** Àrea M2 de l'escorça frontal; la fletxa indica el marcatge de neurites. **F** Lesió focal unilateral al cerebel; destaca el marcatge de neurones de Purkinje (fletxa) i les seves dendrites, però també s'observa degeneració de neurones granulars (cap de fletxa). Barres= aprox. 100 μ m

Els resultats obtinguts en aquest treball permeten definir dos grups diferenciats de nitrils a la rata: els que afecten el sistema nerviós central i els que afecten els sistemes

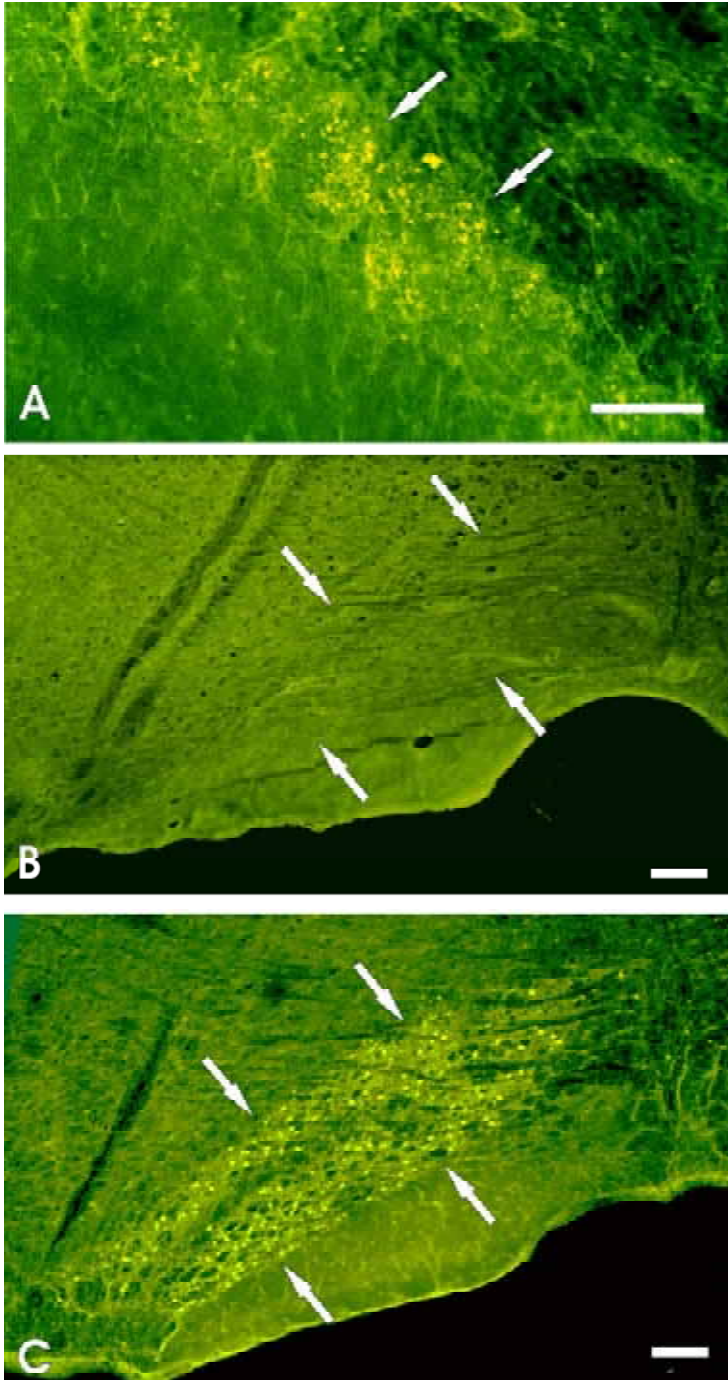


Fig.29 Degeneració en el sistema nerviós central de rates exposades a IDPN, al·lilnitril o *trans*-crotononitril, en seccions coronals (50µm). **A** Bulb olfactori de rata tractada amb IDPN; s'observa marcatge puntiforme de glomèruls olfactoris (fletxes). **B** Oliva inferior (fletxes) de rata tractada amb al·lilnitril; no s'observa marcatge a cap regió del cervell excepte als BO de rates exposades a IDPN, al·lilnitril o *cis*-crotononitril. **C** Marcatge intens de Fluoro - Jade B a l'oliva inferior d'una rata tractada amb *trans*-crotononitril . Barres= 100 µm

sensorials, i situem el *trans*-crotononitril i l'hexadienenitril en el primer, i l'IDPN, el *cis*-crotononitril i l'al·lilnitril en el segon. Els nitrils del primer grup provoquen dèficits motors d'activitat vertical que s'expliquen per la degeneració de neurones de l'oliva inferior (fig. 28) mentre que els del segon grup, provoquen alteracions del comportament espontani, característiques de la síndrome ECC, i que s'expliquen per la degeneració de les cèl·lules ciliades del sistema vestibular i no per degeneració al sistema nerviós central (fig. 29)

La taula següent mostra, en forma resum, els efectes histopatològics d'aquests nitrils incloent-hi dades del treball de tesi i d'altres de procedents d'estudis previs.

SNC	IDPN	al·lilnitril	cis-crotononitril	trans-crotononitril	hexadienenitril
n	(2)	(2)	(3)	(2)	(5)
Bulbs olfactoris	!!	!	!/-	-	!/-
Esc. preimbica	-	-	-	-	++/+
Esc. cingulat	-	-	-	-	++/+
Escorça frontal	-	-	-	(+/-) ¹ /-	++/+
Esc. temp/pariet.	-	-	-	(+/-) ¹ /-	+/-
Esc. piriforme	-	-	-	+++	+++
Estriat	-	-	-	-	-
Nucli anterod. tal.	-	-	-	(+/-) ¹ /-	++/-
Esc. ento. lateral	-	-	-	++	+++
Cerebel	-	-	-	-	&&/-
Oliva inferior	-	-	-	+++	+++
ORELLA INTERNA	IDPN	Al·lilnitril	cis-crotononitril	trans-crotononitril	hexadienenitril
Ep. vestibular	Sí ²	Sí ⁴	Sí ⁵	No ⁵	No (n=3)
Òrgan de Corti	Sí ³	Sí ⁴	Sí ⁵	No ⁵	No (n=3)

Taula 6. Resum dels efectes patològics dels nitrils a l'SNC i a l'orella interna. La taula indica degeneració a l'SNC mitjançant estudis de Fluoro-Jade i degeneració de cèl·lules ciliades mitjançant microscòpia electrònica de rastreig. n: nombre d'animals. -: carència de marcatge Fluoro-Jade B. !, !!, !!!: dèbil, notable o important marcatge de terminals nervioses. +, ++, +++: dèbil, notable o important degeneració cel·lular en determinades àrees o poblacions neuronals. &&: presència d'una lesió focal unilateral notable. Sí/No: degeneració de cèl·lules ciliades. Els números en superíndex indiquen procedència d'altres articles: ¹Seoane *et al.*, 2005; ²Llorens *et al.*, 1993; ³Crofton *et al.*, 1994; ⁴Balbuena and Llorens, 2001; ⁵Balbuena and Llorens, 2003.

Capítol 2

Toxicitat vestibular en espècies mamífers i no mamífers

Article 2*

«Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs and frogs».

SOLER-MARTÍN Carla; Díez-PADRISA Núria; BOADAS-VAELLO Pere; LLORENS Jordi.
Toxicological Sciences, 2007, núm. 96, pàg. 123-132

*Es pot consultar l'article original al web <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/96/1/123>
Per a més informació: jllorens@ub.edu

Resum article 2: «Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs and frogs». SOLER-MARTÍN Carla; DíEZ-PADRISA Núria; BOADAS-VAELLO Pere; LLORENS Jordi. *Toxicol. Sci.*, 2007, núm. 96, pàg. 123-132

El treball que es presenta a continuació demostra que l'associació entre les alteracions comportamentals causades per l'exposició a IDPN o *cis*-crotononitril i la degeneració de cèl·lules ciliades a l'epiteli sensorial vestibular, no succeeix només a la rata, tal com s'havia demostrat en treballs anteriors, sinó que també pot observar-se en altres espècies de rosegadors i en espècies no mamífers, i és, a l'igual que a les rates, un efecte dosi-dependent.

Concretament, el treball demostra toxicitat vestibular al conill d'índies, al ratolí i, com a animal no mamífer, a la granota de l'espècie *Rana perezi*. L'IDPN, en totes les espècies causava una simptomatologia similar i comparable, identificable per un quadre neurològic basat, segons l'espècie, en diverses de les següents alteracions del comportament espontani i motor: ECC, alteracions de l'equilibri, pèrdua de la funció auditiva i dèficit en els reflexos d'incorporació i d'aixecament per la cua, així com també opacitat de còrnia. Pel que fa als ratolins administrats amb *cis*-crotononitril, mostraren també aquesta simptomatologia associada a la degeneració de les cèl·lules ciliades dels epitelis sensorials, igual com passava a la rata.

Capítol 3

Mediació del citocrom P4502E1 en el metabolisme del *cis*-crotononitril i l'al·lilnitril en el ratolí.

Article 3*

«**Determination of cyanide and nitriles in mice and rat whole blood based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography nitrogen phosphorus detection**».

BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; LLORENS Jordi; BAYONA, Josep M.
Journal of Chromatography B (manuscrit enviat)

Article 4**

«**Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of *cis*-crotononitrile in the mouse**».

BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; DíEZ-PADRISA, Núria; BAYONA, Josep M; LLORENS Jordi.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 2007, núm. 225, pàg. 310-317

Article 5*

«**Role of CYP2E1-mediated metabolism in allylnitrile toxicity in the mouse**».

BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; CHABBERT, Christian; BAYONA, Josep M; LLORENS Jordi.
(Article en preparació.)

*Es pot consultar l'article original al web www.sciencedirect.com/science/journal/0041008X

*Per a més informació: jllorens@ub.edu

Resum article 3: «Determination of cyanide and nitriles in mice and rat whole blood based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography nitrogen phosphorus detection». BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; LLORENS, Jordi; BAYONA, Josep M. *Journal of Chromatography B* (document enviat).

L'estudi de les vies metabòliques implicades en la bioactivació de nitrils *in vivo* requeria l'avaluació directa d'aquest metabolisme. Una possible aproximació d'interès era la determinació de les concentracions sanguínies de nitrils i metabòlits representatius, entre els quals destaca el cianur. Entre les diferents tècniques existents, la cromatografia de gasos amb detector nitrogen-fòsfor destacava per ser una tècnica amb la qual seria possible detectar simultàniament aquests compostos d'interès.

En el treball que es presenta a continuació es mostra l'optimització d'un mètode que combina la microextracció en fase sòlida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) i la cromatografia de gasos amb detector nitrogen-fòsfor (GC-NPD). Amb aquest mètode s'ha aconseguit determinar simultàniament cianur i 5 nitrils diferents de cadena curta, tant en sang de rata com de ratolí. Els nitrils en qüestió són: acetonitril, *cis*-crotononitril, *trans*-crotononitril, al·lilnitril i butironitril.

Aquesta tècnica ha estat utilitzada als articles 4 i 5 exposats a l'apartat de resultats d'aquesta mateixa tesi (Boadas-Vaello *et al.*, 2007 i Boadas-Vaello *et al.*, en preparació, respectivament).

Resum article 4: «Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of *cis*-crotonitrile in the mouse». BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; DíEZ-PADRISA, Núria; BAYONA, Josep M; LLORENS, Jordi. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007, núm. 225, 310-317.

El treball que es mostra a continuació, correspon a l'estudi del paper del citocrom CYP2E1 en la neurotoxicitat del *cis*-crotonitril.

Un cop demostrat en el treball anterior (Soler-Martin *et al.*, 2007) que el ratolí és susceptible a la toxicitat vestibular dels nitrils, es va poder plantejar l'ús de soques de ratolins transgènics per a determinar la importància del metabolisme en la neurotoxicitat d'aquests nitrils. En aquest cas, es va hipotetitzar que l'efecte vestibulotòxic del *cis*-crotonitril depenia de la bioactivació per part del citocrom CYP2E1 i per avaluar aquesta hipòtesi, es van utilitzar ratolins *knock-out* pel CYP2E1 (CYP2E1^{-/-}) i la soca salvatge corresponent 129S1.

S'ha treballat amb quatre grups experimentals: 129S1, 129S1 + acetona, CYP2E1^{-/-} i CYP2E1^{-/-} + acetona, en què el pretractament amb acetona 1% en aigua de beguda durant una setmana tenia la finalitat d'augmentar l'expressió del CYP2E1, capacitat inductora demostrada en treballs anteriors (Forkert *et al.*, 1994; Yadav *et al.*, 2006). El resultats obtinguts demostren que, tant els ratolins salvatges com els CYP2E1^{-/-}, pateixen pèrdua de funció vestibular i degeneració de les cèl·lules ciliades de l'epiteli sensorial vestibular després de l'exposició a *cis*-crotonitril i, per tant, el CYP2E1 no és imprescindible per a la toxicitat vestibular d'aquest nitril. Per altra banda, els ratolins salvatges tractats amb acetona 1% en aigua de beguda, mostraven un augment de la mortalitat molt significativa respecte als altres grups, sobretot respecte als CYP2E1^{-/-}.

Mitjançant la metodologia optimitzada d'SPME GC-NPD, explicada a l'article 3 d'aquesta tesi i amb la qual es poden determinar les concentracions de cianur i nitrils en sang, es demostra que la mortalitat d'aquests ratolins ve determinada per l'important augment de cianur en sang sis hores després de l'administració de *cis*-crotonitril 2.25 mmol kg⁻¹. Aquest fet demostra que el *cis*-crotonitril és substrat d'aquest citocrom i que quan és metabolitzat per aquest enzim, s'allibera cianur, el qual en concentracions elevades, pot causar la mort de l'individu.

Resum article 5: «Role of CYP2E1-mediated metabolism in the effects of allylnitrile in the mouse». BOADAS-VAELLO, Pere; JOVER, Èric; CHABBERT, Christian; BAYONA, Josep M.; LLORENS, Jordi. (Article en preparació.)

El treball que es mostra a continuació, correspon a l'estudi del paper del citocrom CYP2E1 en la neurotoxicitat de l'al·lilnitril. Es basa en la hipòtesi que defensa que l'efecte vestibulotòxic de l'al·lilnitril dependria de la bioactivació per part del citocrom CYP2E1. Per avaluar aquesta hipòtesi, es van utilitzar ratolins *knock-out* pel CYP2E1 (CYP2E1^{-/-}) i la soca salvatge corresponent 129S1, repartits en quatre grups: 129S1, 129S1 + acetona, CYP2E1 i CYP2E1 + acetona, en què el pretractament amb acetona 1% en aigua de beguda durant una setmana tenia la finalitat d'augmentar l'expressió del CYP2E1, capacitat inductora demostrada en treballs anteriors (Forkert *et al.*, 1994; Yadav *et al.*, 2006).

El resultat obtinguts demostren que, tant els ratolins salvatges com els CYP2E1^{-/-}, pateixen pèrdua de funció vestibular i degeneració de les cèl·lules ciliades de l'epiteli sensorial vestibular després de l'exposició a al·lilnitril i, per tant, el CYP2E1 no és imprescindible per a la toxicitat vestibular d'aquest nitril.

Els ratolins 129S1 tractats amb acetona 1% en aigua de beguda durant una setmana, mostraren un augment significatiu de mortalitat respecte als altres grups, fet que, utilitzant la metodologia optimitzada d'SPME GC-NPD, es va poder correlacionar amb l'important augment de cianur en sang 20 minuts després de l'administració d'al·lilnitril 0,75 mmol kg⁻¹ en aquest grup. Per tal d'avaluar que l'única diferència metabòlica entre les dues soques era la manca del CYP2E1 en els ratolins transgènics, es va realitzar, tant a ratolins 129S1 com a CYP2E1^{-/-}, un pretractament amb dial·lilsulfur, un inhibidor específic del CYP2E1. Tal com s'esperava, els resultats obtinguts pels ratolins CYP2E1^{-/-} foren idèntics als registrats anteriorment sense el pretractament de dial·lilsulfur, mentre que en els ratolins 129S1, s'observà disfunció vestibular amb una important davallada de la mortalitat, talment com si es tractessin de ratolins de la soca CYP2E1^{-/-}.

Els ratolins CYP2E1^{-/-} administrats amb al·lilnitril, mostraren una alta concentració de cianur. Això feu pensar que l'al·lilnitril, a més de ser substrat del CYP2E1, podria ser metabolitzat per algun altre citocrom, a partir del qual es generaria també cianur. Per

tal de verificar la participació d'altres citocroms en el metabolisme vestibulotòxic d'aquest nitril, es va realitzar, tant a ratolins 129S1 com a CYP2E1^{-/-}, un pretractament amb 1-aminobenzotriazol, un inhibidor universal dels citocroms P450. Com a resultat s'obtingué un bloqueig total dels efectes letals i vestibulotòxics a les dues soques. Aquest fet demostra que la toxicitat vestibular depèn d'un citocrom P450 diferent al 2E1.

En conjunt, els resultats indiquen que el CYP2E1 actua hidroxilant l'al·lilnitril al carboni α , mentre que un altre CYP seria el responsable de la bioactivació per a la toxicitat vestibular, probablement per una acció sobre el doble enllaç β - γ .

IV
DISCUSSIÓ

L'interès per la neurotoxicitat dels nitrils sorgeix a partir de la identificació del β -aminopropionitril (BAPN, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$) i de la 2-cianoetil-isoxazolin-5-ona, un metabòlit precursor del BAPN, a diverses espècies de *Lathyrus*. Es tractava d'identificar el causant del latirisme, sabent que aquesta malaltia estava relacionada amb el consum d'aquesta lleguminosa. Ben aviat l'interès es va centrar en un anàleg sintètic del BAPN, el 3,3'-iminodipropionitril (IDPN, $\text{NH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN})_2$), capaç de causar una síndrome d'alteracions permanents en el comportament motor dels animals d'experimentació (Delay *et al.*, 1954). La mateixa alteració es va observar més tard en animals exposats a altres nitrils com l'al·lilnitril (3-butenenitril, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-CN}$) i el crotononitril (2-butenenitril, $\text{CH}_3\text{-CH}=\text{CH-CN}$) (Tanii *et al.*, 1991a). Aquesta alteració era l'ECC (*Excitation with Choreiform and Circling movements*).

Actualment se sap que l>IDPN, l'al·lilnitril i el crotononitril provoquen degeneració de les cèl·lules ciliades del sistema vestibular i que aquest efecte explica la síndrome comportamental ECC (Llorens *et al.*, 1993; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena i Llorens, 2001; Balbuena i Llorens, 2003). Tot i això, en aquests últims anys, es poden trobar encara treballs on es defensa que l'efecte ECC és causa de la toxicitat en el sistema nerviós central provocada per l'exposició a IDPN. Són estudis d'apoptosi (Zang *et al.*, 1999), d'expressió gènica (Fritschi *et al.*, 2003), de sistemes de neurotransmissors (Tanii *et al.*, 2000, Wakata *et al.*, 2000) i de radicals lliures (Wakata *et al.*, 2000; Nomoto, 2004). En el primer treball d'aquesta tesi, s'ha utilitzat el reconegudament útil Fluoro-Jade B per a detectar neurones en degeneració (Schumed i Hopkins, 2000 a,b; Seoane *et al.*, 2005), i es demostra que rates exposades a IDPN, al·lilnitril o *cis*-crotononitril que presenten la síndrome ECC (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Balbuena i Llorens, 2001; Balbuena i Llorens, 2003) no presenten degeneració neuronal en el sistema nerviós central. A més, aquest mètode ens permet observar que les úniques seccions de cervell que presenten marcatge a rates exposades a aquest tres nitrils, són les dels bulbs olfactoris. Aquest marcatge correspon a la degeneració de les terminals nervioses de les neurones primàries de la mucosa olfactiva nasal, ja que les neurones del bulb no han mostrat marcatge. Aquest fet es relaciona amb la ja coneguda capacitat de l>IDPN de provocar degeneració de l'epiteli sensorial (Genter *et al.*, 1992). Aquests resultats corroboren treballs en els quals s'utilitzava la GFAP com a marcador general de dany cerebral i on s'obtenien increments majors d'aquesta proteïna a bulbs olfactoris en comparació a altres regions de l'SNC (Llorens *et al.*, 1993). A més, amb la utilització de la tinció de

plata, no s'obtenien cossos neuronals marcats a SNC de rates tractades amb IDPN, tal com s'ha observat en aquest treball de tesi mitjançant el Fluro-Jade B.

Per altra banda, ja s'havia demostrat que l'altre isòmer del crotononitril, el *trans*-crotononitril, causa dèficits motors d'activitat vertical (Balbuena i Llorens, 2003) i degeneració de neurones a l'oliva inferior, a l'escorça piriforme, a la part medial de l'escorça entorrinal lateral, al nucli talàmic anterodorsal i d'altres de disperses per tota l'escorça (Seoane *et al.*, 2005). Amb aquests resultats es demostrava per primera vegada que els nitrils poden causar degeneració neuronal selectiva a l'SNC.

En el primer treball d'aquesta tesi, s'ha caracteritzat un nou nitril anomenat hexadienenitril, amb efectes a l'SNC, que ha mostrat un patró selectiu molt semblant al del *trans*-crotononitril. S'ha observat degeneració neuronal selectiva per les regions citades pel *trans*-crotononitril i també a zones de l'escorça prelímbica, de la cingulada i de la frontal. A més, utilitzant microscòpia electrònica de rastreig, s'ha observat que aquest nitril tampoc provoca degeneració de les cèl·lules ciliades dels epitelis vestibular i auditiu.

En resum, els resultats obtinguts a la primera part de la tesi ens permeten definir dos grups diferenciats de nitrils: els que afecten el sistema nerviós central i els que afecten el sensorial, i situem el *trans*-crotononitril i l'hexadienenitril en el primer, i l'IDPN, el *cis*-crotononitril i l'al·lilnitril en el segon. El fet de demostrar que els nitrils poden provocar tant dèficits motors (*trans*-crotononitril i hexadienenitril) com dèficits sensorials (IDPN, *cis*-crotononitril i al·lilnitril), permet fer un pas endavant dins la hipòtesi general que proposa aquests compostos com a causants de les malalties konzo, latirisme i TAN, sabent que les dues primeres es caracteritzen principalment per problemes motors i que en la última es desenvolupen principalment dèficits sensorials.

El mecanisme molecular de la neurotoxicitat dels nitrils és encara desconegut. Tot i que l'IDPN té dos grups nitril i un grup imino, els resultats obtinguts amb l'al·lilnitril i el *cis*-crotononitril (Balbuena i Llorens, 2001; Balbuena i Llorens, 2003) demostren que un sol grup *ciano* és suficient per a desenvolupar els efectes que aquests provoquen a la còrnia i als epitelis vestibular i auditiu i possiblement també els de la retina i de la mucosa olfactiva. Per altra banda, s'ha demostrat que el butironitril no provoca efectes evidents de toxicitat vestibular (Tanii *et al.*, 1989a) i aquest fet permet

suggerir que el doble enllaç present en els butenenitrils podria ser també important en la neurotoxicitat. Alguns treballs indiquen que la presència d'alguna peculiaritat com insaturacions en posicions α o β , és determinant per al potencial neurotòxic del nitril (Llorens *et al.*, 1998; Balbuena i Llorens, 2001; Balbuena i Llorens, 2003). Per altra banda, les diferències entre els isòmers *cis*- i *trans*- del crotononitril suggereixen un alt grau de selectivitat per les seves dianes de toxicitat primàries. Si es requereix el grup *ciano* i el doble enllaç per a provocar neurotoxicitat, la metabolització de l'IDPN a dihidro-IDPN ($\text{CN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH-CH=CH-CN}$) podria ser essencial per a produir neurotoxicitat, tal com van suggerir Syre i els seus col·laboradors (Jacobson *et al.*, 1987). Aquests autors varen intentar demostrar aquesta hipòtesi avaluant directament la neurotoxicitat del dihidro-IDPN i no van reproduir els efectes neurotòxics de l'IDPN (Morandi *et al.*, 1987). Tot i això, la solució de dihidro-IDPN que ells van usar és una mescla dels seus isòmers on el *trans*-dihidro-IDPN era el majoritari (Jacobson *et al.*, 1987). Així, aquest fracàs de no identificar els mateixos efectes que l'IDPN podria ser causa de la manca relativa de l'isòmer *cis*-dihidro-IDPN, el qual causaria aquests efectes buscats. Per altra banda, l'observació en què altes dosis d'aquesta mescla provocaven paràlisi temporal de les potes del darrera, suggereix que el *trans*-dihidro-IDPN causava efectes similars als de *trans*-crotononitril. Aquests resultats permeten suggerir al mateix temps, que el metabolisme *in vivo* de l'IDPN produeix majoritàriament *cis*-dihidro-IDPN.

L'hexadienenitril té en la seva estructura dos dobles enllaços i un grup *ciano* i, per tant, aquest pot organitzar-se en quatre isòmers diferents: *cis,cis*-, *cis,trans*-, *trans,cis*- i *trans,trans*-. El fet que l'hexadienenitril i el *trans*-crotononitril presentin un patró de neurotoxicitat tan semblant fa pensar que la presència del grup *ciano* en posició *trans*- al carboni 2 podria ser suficient per a donar aquest patró selectiu de neurotoxicitat. A més, en aquest treball de tesi s'ha observat un marcatge puntiforme de terminals nervioses primàries dels bulbs olfactoris a 2 de les 5 rates examinades després de l'exposició a hexadienenitril, tal com s'ha observat també amb el *cis*-crotononitril. Tenint en compte que aquest tipus de marcatge coincideix amb el que s'observa quan s'administra la dosi més baixa d'IDPN (Genter *et al.*, 1992) i que, tal com es suggeria anteriorment, l'isòmer majoritari en el metabolisme d'aquest nitril seria el *cis*-dihidro-IDPN, es suggereix que el responsable d'aquest marcatge seria un isòmer *cis*- de l'hexadienenitril, i que aquest isòmer seria minoritari en la mescla. A més, el fet que el *cis*-crotononitril doni aquest mateix tipus de marcatge suggereix

novament que la posició del grup *ciano* en el carboni 2 podria ser important per a la neurotoxicitat selectiva d'aquest nitril. Així, un estudi més exhaustiu de la neurotoxicitat dels isòmers del crotononitril permetria determinar el requeriment real d'un sol doble enllaç a posició C2 i la relació entre la isomeria estructural i les dianes de degeneració específiques.

Per tal d'avançar en l'estudi d'aquests requeriments estructurals de la molècula responsable de la toxicitat, en aquest treball de tesi s'ha estudiat el paper del metabolisme en els efectes vestibulotòxics dels nitrils. Hi ha indicis que assenyalen que el metabolisme podria tenir un paper de bioactivació necessari perquè les accions neurotòxiques fossin efectives, però encara no ha estat identificat cap metabòlit causant de la neurotoxicitat dels nitrils. Per a aquest tipus d'estudi, era molt interessant poder utilitzar soques de ratolins transgènics, però fins al moment, la relació existent entre la síndrome ECC i la degeneració de CC del vestíbul estava demostrada només en rates, tant per l'IDPN (Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Llorens *et al.*, 1993; Seoane *et al.*, 2001) com per l'al·lilnitril (Balbuena i Llorens, 2001) i el *cis*-crotononitril (Balbuena i Llorens, 2003).

En aquest treball de tesi, s'ha adaptat per als ratolins la bateria de tests comportamentals d'avaluació de funció vestibular, desenvolupada prèviament per a les rates, i se n'ha estandarditzat el seu ús. S'han establert, en aquesta espècie, models d'exposició a IDPN, a *cis*-crotononitril i a al·lilnitril que causen toxicitat vestibular i s'han descrit les relacions dosi-resposta comportamental i histopatològica. En conjunt, els resultats han permès demostrar que els nitrils que eren vestibulotòxics a la rata ho són també en el ratolí, la qual cosa permet la utilització de soques de ratolins transgènics per a l'estudi d'aquesta toxicitat. A més, juntament amb estudis paral·lels en els qual s'ha demostrat la toxicitat vestibular de nitrils al conill d'índies, una espècie de gran interès per a l'estudi de l'orella interna, i a la granota, s'ha pogut proposar que els nitrils provoquen toxicitat audiovestibular en un ampli rang de vertebrats, incloent-hi mamífers i no mamífers.

Ohkawa i col·laboradors (1972) proposaren la hipòtesi que defensava que mitjançant la hidroxilació del carboni alfa d'alguns nitrils catalitzada pel citocrom P450, es formaria una cianohidrina intermèdia poc estable que es descompondria ràpidament en cianur i en el corresponent compost carboxílic (fig. 24), hipòtesi que fou corroborada

en animals d'experimentació per altres autors (Silver *et al.*, 1982; Ahmed i Farooqui, 1982; Tanii i Hashimoto, 1984, 1985). Per a l'estudi del metabolisme del *cis*-crotononitril i l'al·lilnitril, es va considerar de gran utilitat poder avaluar les concentracions d'aquest nitril en sang, i també les del cianur. Entre les tècniques descrites a la literatura, la CG-NPD permet l'anàlisi de compostos amb nitrogen o fòsfor, i havia estat utilitzada per a la determinació simultània de cianur i nitrils volàtils amb un mètode *headspace* (Shibata *et al.* 2004). En el treball núm. 3 d'aquesta tesi es descriu l'optimització d'aquest mètode mitjançant l'addició d'un procés de microextracció en fase sòlida (SPME) que permet millorar molt la sensibilitat.

Tanii *et al.* (1986) van demostrar que l'etanol augmentava la toxicitat aguda dels nitrils i sabent que aquest alcohol és inductor del citocrom P4502E1 (CYP2E1), es suggerí que aquest enzim podria estar implicat en els efectes tòxics dels nitrils. Anys més tard, Lewis *et al.*, (1994), demostraren que efectivament el CYP2E1 era el possible responsable de la metabolització de certs nitrils amb la qual es produïa alliberament de cianur.

Més endavant es demostrà que el CYP2E1 pot metabolitzar diversos nitrils (Sumner *et al.*, 1999; Ghanayem *et al.*, 1999), i sembla ser l'únic citocrom P450 involucrat en el metabolisme oxidatiu de l'acrilonitril, on s'allibera cianur (fig. 25) (Wang *et al.*, 2002; Chanas *et al.*, 2003). El *cis*-crotononitril és molt similar a l'acrilonitril ja que els dos són nitrils α - β insaturats, i això permet hipotetitzar que el *cis*-crotononitril podria generar també un epòxid via CYP2E1 (fig. 26) tal com ho fa l'acrilonitril (Sumner *et al.*, 1999). Així doncs, una de les hipòtesis d'aquest treball de tesi era que la metabolització per CYP2E1 era important per a la neurotoxicitat d'aquest nitril, hipòtesi que s'ha estudiat utilitzant les soques de ratolí CYP2E1^{-/-} i WT 129S1, seguint un disseny experimental format per quatre grups: 129S1, 129S1 + acetona, CYP2E1^{-/-} i CYP2E1^{-/-} + acetona, en què el pretractament amb acetona 1% en aigua de beguda durant una setmana tenia la finalitat d'augmentar l'expressió del CYP2E1, capacitat inductora demostrada en treballs anteriors (Forkert *et al.*, 1994; Yadav *et al.*, 2006).

Les soques 129S1 i CYP2E1^{-/-} es mantenen com a soques independents en homozigosi. Malgrat que ambdues soques tenen un fons genètic comú, existia la possibilitat de diferències addicionals a la deleció del CYP2E1. Per a controlar aquesta possible font d'errors, s'ha emprat la inducció amb acetona (Forkert *et al.*, 1994;

Yadav *et al.*, 2006), fet que permet atribuir al CYP2E1 els efectes bloquejats a la soca CYP2E1^{-/-} respecte a la 129S1 i els potenciats per l'acetona a la soca 129S1 però no a la CYP2E1^{-/-}.

Els resultats obtinguts determinaren un efecte vestibulotòxic del *cis*-crotononitril molt semblant a les dues soques, fins i tot més gran a la soca CYP2E1^{-/-}, i per tant el CYP2E1 no sembla ser imprescindible per a desenvolupar els efectes vestibulotòxics del *cis*-crotononitril. Per altra banda, el pretractament amb acetona va provocar un important augment de mortalitat a la soca 129S1 sense haver-hi un augment en la toxicitat vestibular, mentre que a la soca CYP2E1^{-/-} aquest pretractament no determinà ni augment de mortalitat ni de toxicitat vestibular.

Sabent que l'acetona és un inductor de l'expressió del CYP2E1 i tenint en compte la via metabòlica hipotetitzada en aquest treball de tesi (fig. 26), es podria hipotetitzar que l'alt grau de mortalitat dels ratolins 129S1 + acetona es podria explicar per un augment de cianur en sang com a resultat del metabolisme del *cis*-crotononitril pel CYP2E1.

Utilitzant el mètode d'SPME GC-NPD optimitzat (article 3, pàg. 95), es va poder demostrar que el grup de ratolins 129S1 + acetona era el que registrava la quantitat de cianur més alta i la quantitat de *cis*-crotononitril més baixa en sang, mentre que els grups de ratolins CYP2E1^{-/-} registraven nivells de *cis*-crotononitril significativament més alts i nivells de cianur significativament més baixos en comparació amb els altres grups. Així doncs, es demostrava que la gran mortalitat registrada en els 129S1 + acetona era provocada per l'important alliberament de cianur i, tenint en compte la diferència tan significativa en els nivells de *cis*-crotononitril en sang entre els ratolins 129S1 i CYP2E1^{-/-}, es podia confirmar que aquest alliberament de cianur es donava gràcies a la metabolització del *cis*-crotononitril via CYP2E1. Els coneixements disponibles permeten suposar que aquesta metabolització genera una molècula epòxid que, o bé espontàniament o bé mitjançant un enzim tipus epòxid hidrolasa, es transformaria en un diol, la qual cosa portaria finalment a l'alliberament de cianur, tal com s'havia demostrat per l'acrilonitril (Wang *et al.*, 2002).

Els tests comportamentals determinaren que els ratolins supervivents del grup 129S1 + acetona mostraven una disfunció vestibular menor en comparació als altres grups i

això permet suggerir que el CYP2E1 tindria, més aviat, un paper de protecció dels efectes vestibulotòxics del *cis*-crotononitril. En tot cas, els resultats demostren clarament que el CYP2E1 no és necessari per desenvolupar toxicitat vestibular.

La concentració de *cis*-crotononitril en sang és màxima a menys d'una hora després de l'administració, mentre que els efectes vestibulars majoritàriament no apareixen fins a les 24 o 48 hores després. Així, tot i que amb aquest estudi no s'ha pogut determinar quina molècula és la causant de la toxicitat vestibular, aquests resultats permeten suggerir que aquesta seria un metabòlit del *cis*-crotononitril. El cianur circulant en sang no podria ser-ne el causant ja que les concentracions de cianur tan marcadament diferents entre grups no es correlacionen amb diferències en la toxicitat vestibular entre aquests grups. Uns possibles candidats per a la toxicitat vestibular podrien ser l'epòxid generat mitjançant el CYP2E1, el *cis*-2,3-epoxibutironitril (Silver *et al.*, 1982; El Hadri *et al.*, 2005) o el seu corresponent diol fruit d'una hidroxilació, el 2,3-dihidroxibutironitril (fig. 30). Si una d'aquestes molècules fos realment la causant, ha d'existir un altre enzim diferent al CYP2E1 capaç de generar l'epòxid, ja que els ratolins CYP2E1^{-/-} desenvolupen els efectes vestibulotòxics del *cis*-crotononitril. La circulació en sang d'aquests compostos segurament seria més baixa en els ratolins CYP2E1^{-/-} que en els 129S1, i per tant caldria pensar en una formació local d'aquests compostos. És a dir, la via oxidativa del *cis*-crotononitril cap a cianur es donaria de forma sistèmica mitjançant el CYP2E1, però això també passaria de forma local al sistema vestibular mitjançant un altre citocrom, la qual cosa en provocaria la seva degeneració. De fet, encara que sigui en menor grau, tenint en compte que els ratolins CYP2E1^{-/-} administrats amb *cis*-crotononitril també presenten cianur en sang, la possibilitat que altres citocroms puguin catalitzar aquesta transformació metabòlica, és molt probable. De totes maneres, una hipòtesi més senzilla seria que la ruta epòxid cap a cianur no està involucrada en la toxicitat vestibular del *cis*-crotononitril.

El detector de nitrogen-fòsfor detecta molècules amb nitrogen o fòsfor, mentre que el mètode d'SPME s'optimitza per a l'extracció de compostos altament volàtils. El fet que amb el mètode SPME GC-NPD no s'hagi pogut determinar cap possible metabòlit

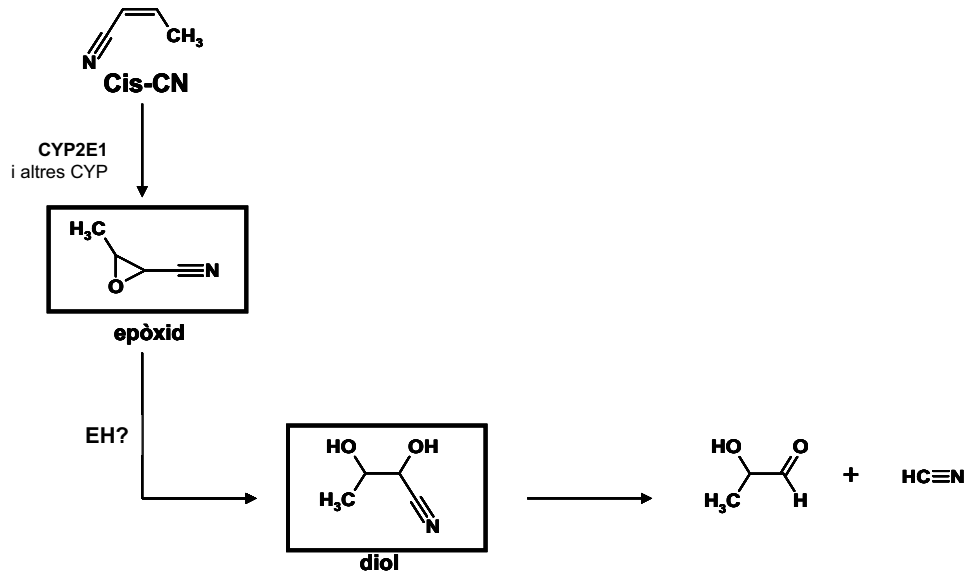


Fig. 30 Esquema d'una possible via metabòlica del *cis*-crotononitril pels seus efectes vestibulotòxics. Els requadres marquen possibles molècules metabòliques candidates a tenir aquest efecte.

provinent dels *cis*-crotononitril a part del cianur, fa pensar que, o bé els metabòlits resultants no són volàtils, o bé han perdut l'àtom de nitrogen. Tot i això, cal tenir en compte la possibilitat d'una acumulació selectiva d'aquests altres metabòlits, diferents del cianur, dins l'orella interna o a les CC, la qual cosa faria possible la no detecció dels metabòlits ototòxics.

Se sap que en rates administrades amb crotononitril barreja de dos isòmers, el crotononitril pot unir-se a glutatió per tal de ser excretat en orina en forma d'àcid cianomercaptúric (Van Bladeren *et al.*, 1981), però de moment no s'ha pogut demostrar que aquesta via tingui relació amb la toxicitat vestibular del crotononitril. Tot i això, una altra via candidata en els efectes vestibulotòxics podria ser aquella en la qual el glutatió s'unís, o bé directament al *cis*-crotononitril, o bé amb el *cis*-2,3-epoxibutironitril format a partir d'un citocrom. En general, els conjugats amb glutatió no són tòxics. No obstant això, els compostos amb alta capacitat de conjugar-se a glutatió poden causar toxicitat per depleció de les concentracions intercel·lulars d'aquest pèptid (fig. 31).

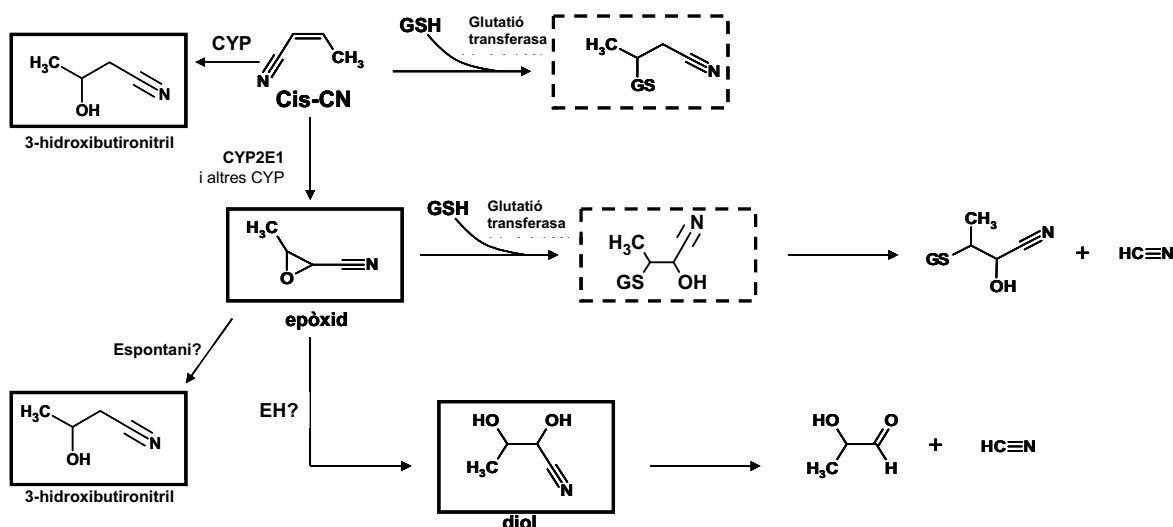


Fig. 31 Esquema global de possibles vies metabòliques pel *cis*-crotononitril. Els requadres amb línia contínua emmarquen possibles molècules candidates a tenir efecte vestibulotòxic. Els requadres amb línia discontinua emmarquen molècules conjugades amb glutatió, que serien candidates més dubtoses per la poca toxicitat d'aquest tipus de conjugats.

Finalment, es poden suggerir altres vies no cianogèniques diferents a la conjugació del glutatió, en les quals es generaria per exemple 3-hidroxiubutironitril (fig. 31). No tenim coneixement que aquestes vies hagin estat mai proposades anteriorment, però serien les vies més lògiques si la via d'epoxidació del doble enllaç quedés finalment descartada com a via d'activació per a la vestibulotoxicitat.

La semblança de l'al·lilnitril amb el *cis*-crotononitril i l'acrilonitril, feu pensar que el CYP2E1 podria estar també implicat en una α -hidroxilació d'aquest nitril (fig. 24) i en l'alliberament de cianur. Per altra banda, però, podria també patir una epoxidació del doble enllaç, la qual no ha de provocar directament alliberament de cianur. En aquest treball de tesi s'ha estudiat, a l'igual que pel *cis*-crotononitril, la importància del CYP2E1 en el metabolisme de l'al·lilnitril i la relació d'aquest amb els seus efectes vestibulotòxics. S'ha utilitzat també un disseny experimental format per quatre grups de ratolins: 129S1, 129S1 + acetona, CYP2E1^{-/-} i CYP2E1^{-/-} + acetona.

Els resultats d'aquest treball han estat similars als de l'estudi del *cis*-crotononitril, perquè s'ha vist que la mortalitat dels 129S1 + acetona tractats amb al·lilnitril era més gran que en els altres grups i aquesta, mitjançant l'SPME GC-NPD, es va poder correlacionar amb alts nivells de cianur en sang. A més, igual que en el cas del *cis*-crotononitril, s'ha vist que el CYP2E1 no era necessari per a provocar toxicitat vestibular ja que tant els 129S1 com els CYP2E1^{-/-} administrats amb al·lilnitril

mostraren disfunció vestibular. Així doncs, la principal conclusió d'aquest estudi ha estat que l'al·lilnitril es metabolitza via CYP2E1, es genera cianur i que aquest últim és el responsable de la letalitat d'aquest nitril.

L'elevada mortalitat en els ratolins 129S1 tractats amb al·lilnitril dificultava la interpretació dels resultats de toxicitat vestibular. Per tal d'obtenir una major certesa del paper relatiu del CYP2E1 en la toxicitat vestibular i la mortalitat d'aquest nitril, es van realitzar experiments addicionals utilitzant inhibidors farmacològics del CYP2E1. L'inhibidor dial·lilsulfur, selectiu pel CYP2E1 (Brady *et al.*, 1991), va permetre corroborar en els ratolins 129S1, que la disminució d'activitat CYP2E1 disminueix la mortalitat, però no la toxicitat vestibular, mentre que l'absència d'efectes d'aquest inhibidor sobre la toxicitat d'al·lilnitril en els ratolins CYP2E1^{-/-}, corroborava la selectivitat d'aquest agent per a aquest citocrom.

El pretractament amb 1-ABT, un inhibidor universal dels citocroms P450, va provocar una inhibició total tant dels efectes letals com dels vestibulotòxics a les dues soques. Així doncs, amb aquest estudi es demostra clarament la implicació d'algun altre CYP, diferent al 2E1, en els efectes vestibulotòxics de l'al·lilnitril, encara que aquest resultat no permet discernir el caràcter cianogènic o no cianogènic d'aquesta via de toxicitat vestibular.

Tot i la gran similitud entre els resultats obtinguts en els dos estudis, existeixen diferències importants. En el cas del *cis*-crotononitril, el CYP2E1 catalitzaria l'epoxidació del doble enllaç en posició α - β , cosa que provocaria la formació d'una cianohidrina i l'alliberament de cianur (fig. 30). En el cas de l'al·lilnitril, que és una molècula β,γ -insaturada, el CYP2E1 tindria dues possibles actuacions: l'hidroxilació del carboni α (Ohkawa *et al.*, 1972; Silver *et al.*, 1982) o l'epoxidació del doble enllaç β,γ (Silver *et al.*, 1982). Tenint en compte que només en la primera actuació suggerida hi hauria la formació d'una cianohidrina inestable i la posterior formació de cianur, els resultats d'aquest treball de tesi indiquen clarament que el CYP2E1 realitza aquesta acció i no la segona (fig. 32).

Per altra banda, tenint en compte la quantitat de cianur detectada en els ratolins CYP2E1^{-/-} administrats, es suggereix que un altre CYP també podria catalitzar l' α -hidroxilació. Si bé els nostres resultats demostren que el CYP2E1 impulsa la via

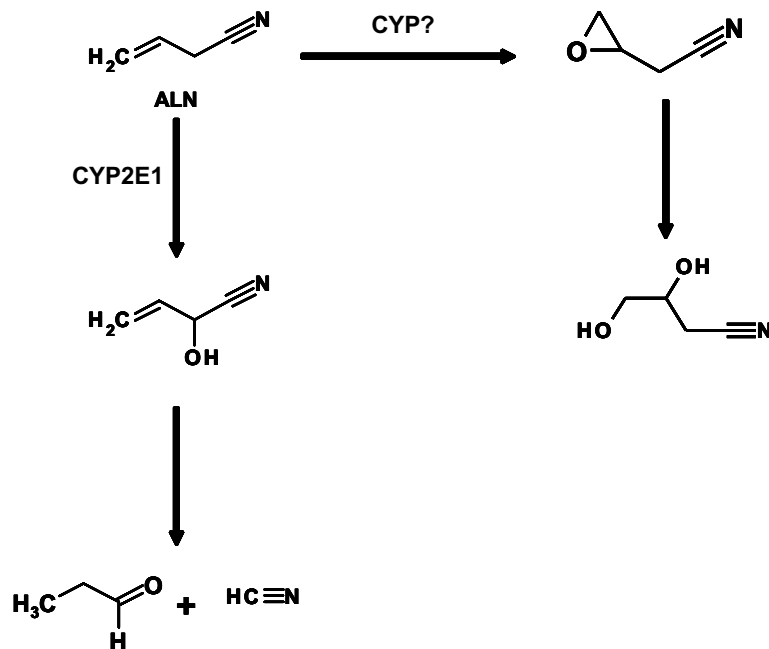


Fig. 32 Esquema de dues rutes metabòliques possibles per a l'al·lilnitril. L' α -hidroxilació que produeix l'alliberament de cianur estaria catalitzada pel CYP2E1.

cianogènica i que no té cap paper en la toxicitat vestibular, no permet excloure que aquesta mateixa via sigui responsable de la degeneració de CC a través d'un altre CYP, amb acció local a l'orella interna. Una hipòtesi alternativa per als afectes vestibulotòxics, podria ser que les molècules resultants de l'epoxidació del doble enllaç β - γ de l'al·lilnitril mitjançant un CYP diferent al 2E1 fossin ototòxiques. Podrien ser molècules candidates l'epòxid generat en aquesta epoxidació o el diol que se'n pogués derivar posteriorment per l'acció d'una epòxid hidrolasa (fig. 33). Per altra banda, se sap que el glutatió podria reaccionar també amb l'estructura diol (fig. 33) (Faroqui *et al.*, 1991), encara que els conjugats amb glutatió se'ls suposa una baixa toxicitat intrínseca.

Per últim, existeix una opció en la qual el glutatió podria reaccionar directament amb la molècula d'al·lilnitril. En aquest cas, a més a més del paper destoxicador de la conjugació amb glutatió, els resultats obtinguts amb el pretractament amb 1-ABT que revelen la necessitat d'un CYP per a desenvolupar-se els efectes vestibulotòxics, permeten concloure que aquesta via no és rellevant per a desencadenar els efectes ototòxics.

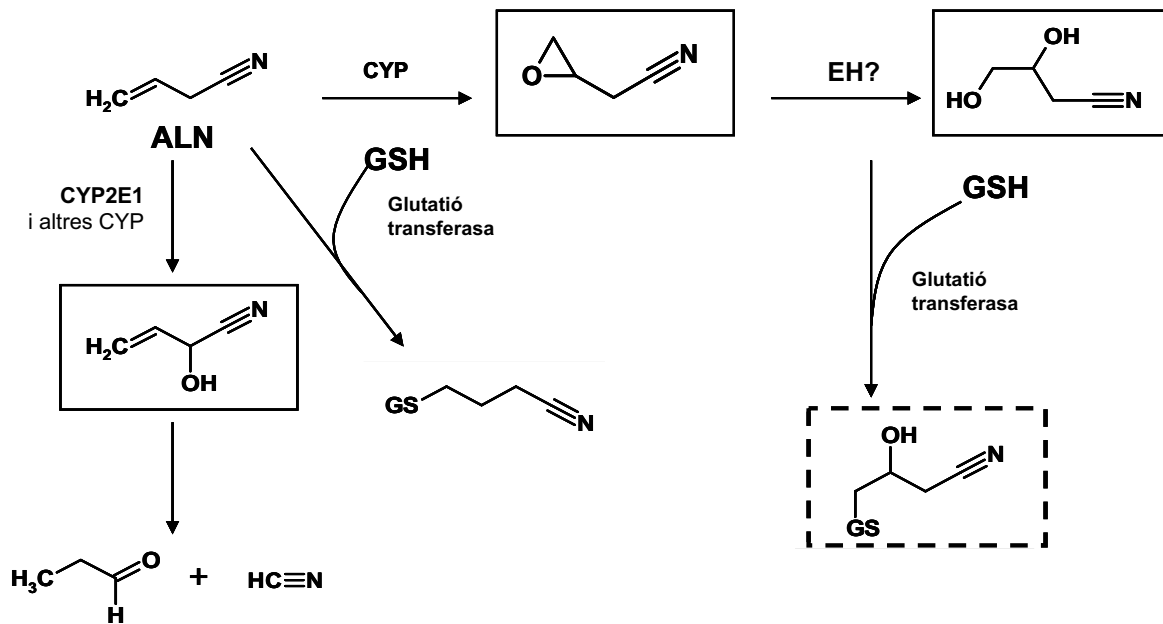


Fig. 33 Esquema de possibles vies metabòliques per l'al·lilnitril. Els requadres amb línia contínua emmarquen possibles molècules candidates a tenir efecte ototòxic. El requadre amb línia discontinua emmarca una molècula conjugada amb glutatió, que seria una candidata més dubtosa per la poca toxicitat d'aquest tipus de conjugats.

En conjunt, els resultats obtinguts a la segona part de la tesi demostren que el CYP2E1 metabolitza tant el *cis*-crotononitril com l'al·lilnitril, però que cap d'aquestes accions és necessària per a l'acció vestibulotòxica d'aquests nitrils. No obstant això, altres CYP tenen un paper bioactivador per a aquesta toxicitat. Els dos nitrils causen en animals d'experimentació els mateixos efectes vestibulotòxics i això permet suggerir que, en el procés de metabolització de cadascun d'ells, podria generar-se una molècula similar i que aquesta fos la responsable de l'ototoxicitat. Tot i no tenir encara enzims candidats per a realitzar-ne la catalització, sí que es pot suggerir que una estructura molecular comuna generada pels dos nitrils podria ser la 3-hidroxi-butironitril, que es podria formar tant pel trencament del doble enllaç en posició α - β del *cis*-crotononitril, com pel trencament del β - γ de l'al·lilnitril (fig. 34). Aquesta hipòtesi podria a més, relacionar-se amb un altre nitril vestibulotòxic, l'IDPN, el qual, mitjançant un citocrom P450 deriva a una molècula que té en posició 3 un grup hidroxil, la carbinolamina, molècula de la qual se'n troben derivats a l'orina de rates administrades amb aquest nitril (Jacobson *et al.*, 1987; Engelhart, 1994) (fig. 23).

Si en estudis posteriors es demostrés aquesta hipòtesi, tindríem com a resultat que tres nitrils amb efectes vestibulotòxics idèntics serien metabolitzats pel sistema microsomal, pel qual es generarien molècules amb una estructura química similar que

seria responsable d'aquests efectes. La identificació d'aquesta estructura suposaria un avanç crucial en l'estudi de la neurotoxicitat dels nitrils.

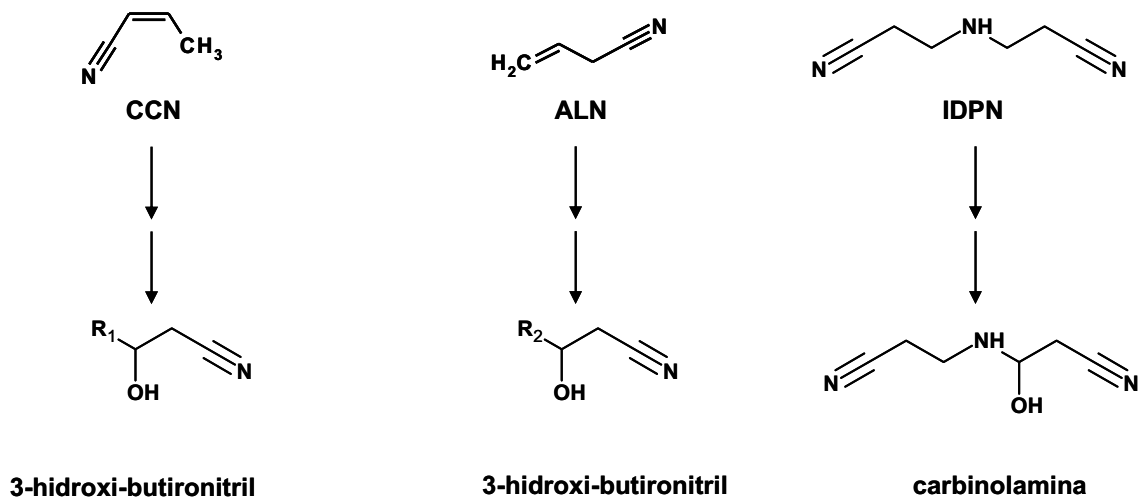


Fig. 34 Esquema d'estructures hidroxí suggerides com a candidates a provocar efectes vestibulotòxics en animals d'experimentació produïdes mitjançant el sistema microsomal a partir de tres nitrils ototòxics: *cis*-crotononitril, al·lilnitril i IDPN.

V
CONCLUSIONS

Conclusions

- 1.** L' IDPN, l'al·lilnitril i el *cis*-crotononitril no causen degeneració neuronal al sistema nerviós central, excepte les terminals nervioses als glomèruls olfactoris. Per tant, els efectes d'aquests nitrils sobre el comportament motor no estan associats a la degeneració neuronal. Aquesta conclusió concorda plenament amb els treballs anteriors, en els quals es conclouia que aquests efectes depenen de la degeneració del sistema vestibular.
- 2.** L'hexadienenitril i el *trans*-crotononitril indueixen un patró de degeneració neuronal selectiva al sistema nerviós central de la rata: oliva inferior, escorça piriforme i escorça entorrinal. Les rates tractades amb hexadienenitril també presenten degeneració a l'escorça frontal i a la cingulada. Els efectes de l'hexadienenitril i el *trans*-crotononitril sobre el comportament motor estan associats a la degeneració de l'oliva inferior. Tot i això cal investigar més sobre la possible contribució de la degeneració neuronal trobada a l'escorça motora de rates tractades amb hexadienenitril.
- 3.** Les conclusions anteriors permeten agrupar els nitrils neurotòxics en nitrils que causen toxicitat sensorial (IDPN, al·lilnitril i *cis*-crotononitril) i nitrils que causen un patró de degeneració neuronal selectiu en el sistema nerviós central (*trans*-crotononitril i hexadienenitril.)
- 4.** La toxicitat audiovestibular de nitrils, fins ara demostrada només a la rata, apareix també en altres espècies, incloent-hi mamífers (ratolí i conill d'índies) i no mamífers (granota).
- 5.** La bateria de tests comportamentals dissenyada per a l'avaluació de la disfunció vestibular a la rata és també aplicable al ratolí.
- 6.** La tècnica de microextracció en fase sòlida acoblada a una cromatografia de gasos amb un detector nitrogen-fòsfor (SPME GC-NPD) permet l'avaluació simultània de cianur i de nitrils volàtils (*cis*-crotononitril, *trans*-crotononitril, al·lilnitril, acetonitril i butironitril) en sang.

- 7.** Els *cis*-crotononitril és substrat del CYP2E1 *in vivo* en el ratolí. L'acció metabòlica d'aquest citocrom sobre el *cis*-crotononitril genera cianur i s'associa a la mortalitat, però no necessàriament a la toxicitat vestibular, ja que la manca del CYP2E1 en ratolins *knock-out* no protegeix contra l'acció vestibulotòxica d'aquest nitril.

- 8.** L'al·lilnitril és substrat del CYP2E1 *in vivo* en el ratolí. L'acció metabòlica d'aquest citocrom sobre l'al·lilnitril genera cianur i s'associa a la mortalitat. Això indica que el CYP2E1 catalitza la α -hidroxilació i no la β - γ epoxidació d'aquest nitril.

- 9.** Vist el paper cianogènic del CYP2E1 tant per al *cis*-crotononitril com per a l'al·lilnitril i vistos els efectes d'agents inhibidors selectius i no selectius del P4502E1 sobre la toxicitat vestibular, es pot concloure que aquesta toxicitat depèn d'un citocrom P450 diferent al 2E1 i, paral·lelament, es poden descartar les cianohidrines (2-hidroxinitrils) com a metabòlits circulants responsables.

VI

MATERIAL I MÈTODES

A. Materials i compostos químics

A.1 Compostos químics

Crotononitril (99%, proporció *cis:trans* de 60:40 aproximadament). Obtingut de Química Aldrich (Alcobendas, Espanya). Els corresponents isòmers s'obtingueren per destil·lació fraccionada (Balbuena i Llorens, 2003). Per aquest treball s'han utilitzat fraccions destil·lades amb un índex de puresa superior al 95%.

Cianur de potassi. Obtingut de Fluka (Buchs, Suïssa).

Al·lilnitril (98%), butironitril, i acetonitril (Lichrosolv®). Obtinguts de Merck (Hohenbrunn bei München, Alemanya).

IDPN (99%). Obtingut d'Acros Organics (Geel, Bèlgica).

Hexadienenitril (98%). Obtingut de Frinton Laboratories (Vineland, NJ, EEUU).

Fluoro-Jade B. Obtingut de Chemicon International (Temecula, CA, EEUU).

A.2 Animals utilitzats

L'ús i tractament dels animals es va fer en concordança amb la LLEI 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques, i amb el DECRET 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques, de la Generalitat de Catalunya, seguint procediments aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

Els experiments es van portar a terme a l'estabulari del Campus Bellvitge de la Universitat de Barcelona i es van utilitzar els següents tipus d'animals:

- Rates mascle *Long-Evans* (CERJ, Le-Genest-Saint-Icle, França) de 9 setmanes d'edat que es van estabular en grups de 2 a 4 per gàbia (gàbies Macrolon estàndard 280 x 520 x 145 mm).

- Rates mascle *Sprague-Dawley* procedents de la cria realitzada a l'estabulari de Bellvitge.
- Ratolins de la soca 129S1/SvImJ, adquirida dels Laboratoris Jacksons (USA), i de la soca CYP2E1^{-/-}, cedida per F.J.Gonzalez (US NIH, Bethesda, USA). A partir de les parelles reproductores obtingudes inicialment, s'establiren dues colònies a l'estabulari del Campus Bellvitge de la Universitat de Barcelona. Després del naixement i el deslletament, les cries es col·locaren en grups de 4 a 6 en gàbies Macrolon (28 x 28 x 15 cm)
- Ratolins mascle Hsd:ICR (CD-1) (Harlan Internauta Ibèrica, Sant Feliu de Codines), coneguts com a ratolins *Swiss*, de vuit setmanes d'edat que es van estabular en grups de 2 a 4 per gàbia (gàbies Macrolon estàndard 28 x 52 x 15 cm). Per als estudis preliminars es van utilitzar ratolins de les mateixes característiques obtinguts d'una colònia establerta a l'estabulari del campus.

A l'estabulari, tots els animals es mantenen amb un fotoperíode 12:12h, a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i s'alimentaven *ad libitum* (Harlan Teklad Global Diet 2014). Els de procedència externa, com a mínim van restar 7 dies a l'estabulari per a la seva aclimatació abans de fer-ne ús experimental.

A.3 Administració i obtenció de mostres

Les rates *Long-Evans* van ser administrades intraperitonealment durant 3 dies consecutius. Les dosis van ser seleccionades en base a treballs previs del nostre laboratori (Llorens *et al.*, 1993a; Seoane *et al.*, 1999, 2005; Balbuena i Llorens, 2001, 2003) i van ser les següents:

- *cis*-crotononitril: $110 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en 1 ml Kg^{-1} oli de blat de moro
- *trans*-crotononitril: $250 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en 1 ml Kg^{-1} oli de blat de moro
- al·lilnitril: $50 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en 2 ml Kg^{-1} oli d'oliva
- hexadienenitril: $300 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en 2 ml Kg^{-1} oli oliva
- IDPN: $400 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en 2 ml Kg^{-1} salí
- controls: $1 \text{ ml Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ d'oli de blat de moro i $2 \text{ ml Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ d'oli d'oliva

Els ratolins van ser administrats oralment per intubació intragàstrica amb *cis*-crotononitril o al·lilnitril dissolts en 6 ml kg⁻¹ oli de blat de moro. En base a treballs previs pilot del nostre laboratori, les dosis utilitzades en els experiments van ser les següents:

- *cis*-crotononitril: 0, 2, 2.25 i 2.5 mmol Kg⁻¹ en 6 ml kg⁻¹ oli de blat de moro
- al·lilnitril: 0, 0.5, 0.75 i 1 mmol Kg⁻¹ en 6 ml kg⁻¹ oli de blat de moro
- IDPN: 8, 16, i 24 mmol kg⁻¹ en 10 ml kg⁻¹ salí

Per a la histologia, els animals van ser anestesiats amb 400 mg kg⁻¹ d'hidrat cloral i després de decapitar-los es fixaren els ossos temporals per immersió en solució fixadora freda per tal de disseccionar ràpidament els epitelis sensorials de l'orella interna.

En els experiments d'anàlisi de sang, tant els ratolins com les rates *Sprague-Dawley* s'anestesiaren també amb 400 mg kg⁻¹ d'hidrat cloral i mitjançant una punció intracardíaca s'extragueren uns 600 µl de sang de cada ratolí i uns 10 ml de cada rata. En aquests experiments es van utilitzar les dosis de 2.25 mmol kg⁻¹ de *cis*-crotononitril i de 0,75 mmol kg⁻¹ d'al·lilnitril.

Per a l'estudi dels efectes dels inhibidors dial·lilsulfur (DAS) i aminobenzatriazol (1-ABT) en ratolins CYP2E1^{-/-} i 129S1 s'utilitzaren les dosis següents:

- 1-ABT 50 mg kg⁻¹ en 3 ml kg⁻¹ salí. 2 hores abans i 24 hores després de l'administració d'al·lilnitril (1 mmol kg⁻¹)
- Dial·lilsulfur 200 mg kg⁻¹ en 6 ml kg⁻¹ oli de blat de moro. 24 i 2 hores abans i 24 hores després de l'administració d'al·lilnitril (1 mmol kg⁻¹).

A.4 Avaluació de la toxicitat en l'animal viu

a.4.1 Opacitat de la còrnia

Per simple observació, es va avaluar l'opacitat de còrnia induïda per nitrils. Aquesta es puntuava amb un valor comprès entre 0 i 4, en què 0 indica que no hi ha opacitat i 4 que hi ha opacitat extrema (Seoane *et al.*, 1999; Balbuena i Llorens, 2001).

a.4.2 Funció vestibular

Tant a les rates com als ratolins, l'alteració de la funció vestibular es va avaluar utilitzant una bateria de tests comportamentals semiquantitatius. Aquesta bateria de tests ha estat utilitzada per avaluar, de manera molt satisfactòria, la pèrdua de funció vestibular causada per l'extirpació bilateral del laberint, quirúrgicament (Llorens *et al.*, 1993b) i químicament (Llorens i Rodríguez-Farré, 1997), així com la causada per la toxicitat de l'IDPN (Llorens *et al.*, 1993b), de l'al·lilnitril (Balbuena i Llorens, 2001) i del *cis*-crotononitril (Balbuena i Llorens, 2003). La bateria inclou observacions del comportament motor espontani (Crofton i Knight, 1991), el reflex d'aixecament per la cua (Selye, 1957; Hunt *et al.*, 1987), la inhibició per contacte del reflex d'incorporació (Shoham *et al.*, 1989; Ossenkopp *et al.*, 1990) i el reflex d'incorporació en l'aire (Ossenkopp *et al.*, 1990). Per a cada tipus de moviment o reflex, es donava una puntuació d'entre 0 i 4, en què cada puntuació significava el següent:

- 0: no hi ha alteració.
- 1: pot haver-hi alteració però no de forma clara.
- 2: hi ha alteració clara però poc important.
- 3: alteració important.
- 4: alteració extrema

El resultat final d'aquesta bateria de tests per a cada animal consistia en la suma del valors puntuats en cada un i es podia obtenir com a màxim un valor de 24 punts.

a.4.2.1 Avaluació del comportament motor espontani

Per a l'observació del comportament motor espontani, les rates es van introduir durant un minut dins un cub de vidre de 50 x 50 cm i els ratolins en una gàbia de plàstic de 28 x 52 cm i es van puntuar els seus moviments: cercles, retropulsió i extensió anormal del cap. Els moviments en cercles corresponen a una activitat estereotipada de locomoció en cercles. La retropulsió consisteix a caminar enrere. El moviment del cap a avaluar consisteix en hiperextensions extremes del coll cap enrere.

a.4.2.2 Reflex d'aixecament per la cua



Fig.35 Test d'aixecament per la cua d'una rata vestibulodeficient.

Quan una rata o un ratolí són aixecats per la cua, estenen les potes del davant de forma espontània per tal de preparar-se per a un possible aterratge. A les rates o ratolins que presenten un dèficit vestibular, aquest reflex és substituït per un altre que consisteix en la curvatura de l'animal sobre ell mateix en direcció ventral (fig. 35).

a.4.2.3 Inhibició per contacte del reflex d'incorporació

Per avaluar la inhibició per contacte del reflex d'incorporació, els animals es van col·locar en posició decúbit supí sobre una superfície horitzontal i se'ls va col·locar una superfície en contacte amb les potes. Els animals sense alteracions giren espontàniament mentre que els que tenen lesions vestibulars resten en aquesta posició movent-se talment com si estiguessin caminant del dret (fig. 36) (Shoham *et al.*, 1989).



Fig.36 Test d'inhibició per contacte del reflex d'incorporació d'una rata vestibulodeficient.

a.4.2.4 Reflex d'incorporació en l'aire

Pel reflex d'incorporació en l'aire, les rates es mantenen sostingudes amb la mà en posició decúbit supí a uns 40 cm d'una superfície tova i es deixaven caure. Les rates normals es giren ràpidament per tal de caure sobre les quatre potes, mentre que les vestibulodeficients no. En el cas dels ratolins, eren agafats per la base de la cua i llençats fins a una altura d'uns 15 cm de tal manera que en aquesta altura quedessin en posició decúbit supí. Els ratolins normals queien sobre les quatre potes, mentre que els vestibulodeficients no.

a.4.3 Camp obert



Fig.37 Camp obert per avaluar activitat de les rates.

nombre d'aixecaments que feien sobre les dues potes (Llorens *et al.*, 1993b). Per als ratolins, el mètode va ser el mateix però el camp obert mesurava 50 x 50 cm, la superfície estava dividida en quadres de 10 cm de costat i la llum era vermella de 40W.

a.4.4 Anàlisi del patró de la marxa

L'avaluació del patró de la marxa de les rates es va fer segons la descripció de Parker i Clark (1990). Després de tnyir les potes del davant i del darrera de les rates amb dos colors diferents (negre i vermell respectivament), es fa caminar l'animal sobre un paper col·locat en una passera de fusta elevada, per obtenir així les empremtes de l'animal (fig. 38). Sobre aquest paper, es poden mesurar la llargada i l'amplada de pas. Aquests

Els estudis de camp obert en rates es van fer en una àrea de fusta blanca d'1 m x 1 m dividida en quadres de 20 x 20 cm mitjançant línies negres, tancada per quatre parets de 50 cm d'altura i il·luminada amb una llum de 100 W col·locada a 70 cm del terra. (fig.37). Per a cada rata, es mesurava durant 5 minuts el nombre de quadres que creuaven amb les 4 potes i el

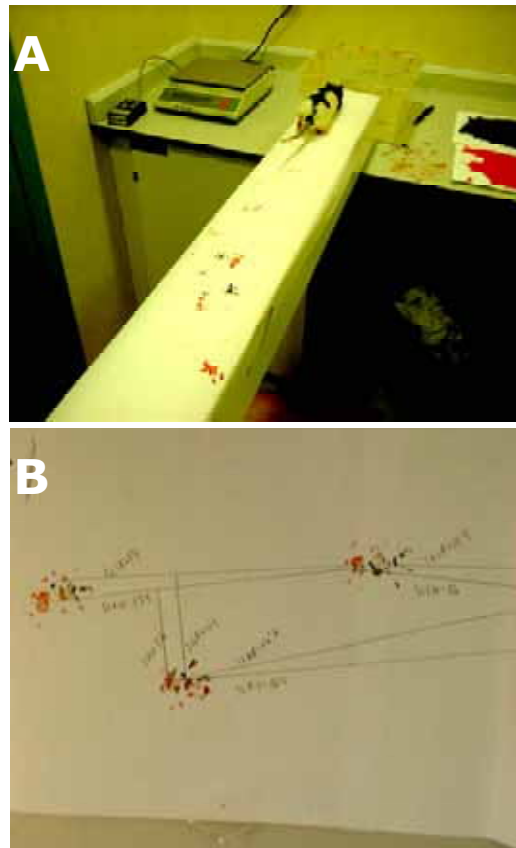


Fig. 38 A Procés d'obtenció d'empremtes de rata dalt d'una passarel·la empaperada. **B** Mesures de la llargada i de l'amplada de pas d'empremtes de rata.

paràmetres són sensibles a la neurotoxicitat del *trans*-crotononitril (Seoane *et al.*, 2005).

a.4.5 Escala vertical



Fig. 39 Escala vertical per a rates.

A les rates, se'ls va avaluar la capacitat d'aguantar-se durant 120 segons en posició vertical enfilades dalt d'una escala (barres 3 mm de gruix i 18 mm entre barres). Aquesta es va col·locar verticalment dins un tub acrílic sobre un aparell de placa calenta (Model-DS37, Ugo Basile, Comerio; VA, Itàlia) i cobert amb una tapa per evitar que l'animal s'escapés (fig. 39). La temperatura de la placa era de 56°C. Dies abans de l'experiment les rates van estar sotmeses a un entrenament on s'anava incrementant el temps en què l'animal havia d'aguantar-se dalt de l'escala fins

a aconseguir que tots ells aguantessin 90 segons perfectament. Concretament es van fer dos entrenaments per dia durant 4 dies amb una seqüència creixent de 20, 40, 60, 90, 90, 90 i 90 segons. En els dies de test, es deixava sortir les rates per dalt de l'escala després d'aguantar 120 segons o bé després del tercer intent fallit en el procés d'aconseguir aquesta marca. Els resultats obtinguts en el test van ser o bé els 120 segons aguantats en el primer intent o bé la mitjana dels temps aguantats en el primer i segon intents (si en el segon intent aguanta 120 segons es fa la mitjana igualment).

A.5 Tècniques histològiques

En el cas de les rates, per a la identificació de neurones en degeneració a l'SNC, els animals van ser anestesiats amb hidrat cloral i perfosos amb paraformaldehid al 4% en tampó fosfat 0.1M. Posteriorment es va extreure el cervell sencer i dos segments de medul·la espinal (cervical i lumbar) i es van deixar submergits a la mateixa solució de fixador de 12h a 7 dies a 4°C. Utilitzant un micròtom de fulla vibrant (Leica VT 1000M), es van fer seccions de 50 µm, i un de cada tres talls va ser tenyit amb Fluoro-Jade B, un colorant específic per a neurones en degeneració (Schumed i Hopkins, 2000 a,b). Les neurones en degeneració van ser identificades comparant els talls tenyits

amb Fluoro-Jade B amb les fotografies de talls de cervell normal de l'atles de Paxinos i Watson, (1999).

Per tal d'avaluar la possible patologia a l'orella interna de les rates administrades amb hexadienitril, i dels ratolins administrats amb *cis*-crotonitril i al·lilnitril, es van examinar preparacions dels epitelis vestibular i auditiu mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (SEM), tal com s'havia fet anteriorment amb l'IDPN (Llorens *et al.*, 1993b; Llorens i Rodríguez-Farré, 1997; Seoane *et al.*, 2001), l'al·lilnitril (Balbuena i Llorens, 2001), i el *cis*- i *trans*-crotonitril (Balbuena i Llorens, 2003). Els animals van ser perfosos amb glutaralhid al 2.5% en tampó cacodilat 0.1M (pH 7.2). Després de la perfusió es va fer la dissecció dels epitelis mantenint-los sempre submergits en el mateix fixador i posteriorment es van deixar fixant-se 1.5 hores més. La dissecció incloïa tots els receptors vestibulars, tota la part apical de l'òrgan de Corti i fragments de les parts medial i basal d'aquest últim. Les mostres van ser processades per a la seva observació per SEM i observades al microscopi LICA 360 SEM amb un voltatge d'acceleració d'entre 7 i 15 kv.

a.5.1 Fluoro-Jade B

El protocol seguit per a aquesta tinció va ser el següent:

1. Muntatge dels talls de 50 μm en portaobjectes gelatinitzats amb aigua destil·lada
2. Assecatge a l'estufa a 50°C durant 20 min (comprovar que estan secs)
3. Bany en etanol 100% (3min)
4. Bany en etanol 70% (1min)
5. Bany en aigua destil·lada (1min)
6. Bany en solució permanganat de potassi 0.06% (10 min d'agitació suau)
 - 150 mg de permanganat de potassi
 - 250 ml d'aigua destil·lada.
7. Bany en aigua destil·lada (1 min)

8. Bany en solució Fluoro-Jade (40 min d'agitació suau en fred i protegida de la llum)

Fluoro-Jade 0.003% (agitació suau i protegida de la llum)

- 24 ml Solució Mare (Fluoro-Jade 0.01%)
- 56 ml 0.1% àcid acètic en aigua destil·lada

Fluoro-Jade 0.01%, estable 2 mesos a 4°C i protegit de la llum

- 10 mg Fluoro-Jade (sec i protegit de llum)
- 100 ml d'aigua destil·lada

9. Rentats amb aigua destil·lada (3 x 1min)

10. Assecatge ràpid (assecador)

11. Bany de xilol

12. Muntatge de mostres amb DPX (Segellar el cobreobjectes amb pintaungles transparent)

a.5.2.- Preparació de mostres per SEM

El protocol següent va ser el següent:

1. Postfixació, després de la dissecció, de les mostres lliures de membrana (Immersió durant 1.5h en el mateix fixador de perfusió i dissecció)

2. Rentats amb tampó cacodilat sense glutaraldehyd (2 x 5 min)

4. Fixació amb tetròxid d'osmi en tampó cacodilat al 1% (1 hora.)

5. Rentats amb tampó cacodilat sense glutaraldehyd (2 x 5 min)

6. Bany en etanol 70° fins l'endemà.

7. Deshidratació (les mostres s'encapsulen en una membrana porosa que permet el pas de líquids al seu interior)

- alcohol 96° (2 x 30 min)
- alcohol 100° (3 x 30 min)

8. Assecatge a punt crític i recobriments amb or (als serveis científicotècnics de la Universitat de Barcelona)

9. Observació al microscopi electrònic de rastreig

A.6.- Anàlisis quimicoanalítiques

Per a la determinació simultània de cianur i nitrils en sang, s'utilitzà la tècnica l'optimització de la qual es descriu detalladament al capítol 3 de l'apartat de resultats d'aquest treball de tesi. Explicat resumidament, s'extreien 600 µl de sang per punció intracardíaca, es recollia en un vial de 4 ml que contenia 400 µl de tampó acètic/acetat 0.1M (pH= 4.3) fred i s'emmagatzemava a -24°C. A les mostres s'hi afegia acetonitril com a estàndard intern (1.8 µg), HCl 25% (5 µl) per acidificar-les i s'analitzaven mitjançant la tècnica SPME GC-NPD (*Solid Phase Microextraction Gas Chromatography – Nitrogen Phosphor Detector*), utilitzant una fibra de carboxè- polidimetilsiloxà 0,75 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) i una columna cromatogràfica J&W Gs-GasPRO (60 m x 0.32 mm ID) (Folsom, CA, USA). L'extracció de molècules volàtils mitjançant SPME es feu durant 35 min a 37°C en agitació constant i passat aquest temps s'injectava la fibra a l'aparell cromatogràfic MFC 500 (de Carlo Erba, Milà, Itàlia). La temperatura de l'injector i el detector de l'aparell de cromatografia de gasos era de 260°C i la temperatura del forn fou programada amb la següent rampa: 130°C (1 min) augment de 2°C per minut fins a 150°C (0 min), i finalment 8°C per minut fins a 260°C (15 min).

A.7.- Anàlisis estadístiques

Els resultats del test d'escala vertical van ser analitzats mitjançant l'anàlisi de variància de Kruskal-Wallis, fent comparacions per parelles amb el test d'U de Mann-Whitney. Els altres resultats corresponents a la primera part de la tesi van ser analitzats o bé amb un test d'ANOVA d'un factor o bé amb un test MANOVA de mesures repetides. Per fer les anàlisis post-hoc es van usar contrastos ortogonals seguits del test de Duncan.

El percentatge de mortalitat de ratolins va ser analitzat mitjançant taules de contingència. Les dades de supervivència van ser analitzades mitjançant l'anàlisi de Kaplan-Meier, amb comparacions en parelles mitjançant l'estadístic de Breslow. Els resultats de comportament de ratolins van ser analitzats amb un test de MANOVA de mesures repetides. Per fer les anàlisis post-hoc es van usar contrastos ortogonals seguits del test de Duncan. Per als resultats de la sang, s'utilitzà una ANOVA d'un factor.

Per a tots aquests estudis estadístics es va utilitzar el paquet de programes SPSS 12.0.1 per Windows. El nivell de significació α es va situar a $p < 0.05$.

Pel que fa als resultats obtinguts en l'optimització de l'SPME GC-NPD, aquests van ser analitzats estadísticament amb un model de regressió polinomial utilitzant el programa SPSS 13.0. Per a l'obtenció de les gràfiques de superfície dels analits s'utilitzà el programa Matlab 7.0.

VII

BIBLIOGRAFIA i URLgrafia

Bibliografia

A

AHMED A. E.; TRIEFF, N. M. «Aliphatic nitriles; metabolism and toxicity». A: *Progress in drug metabolism*, 1983, vol 7 (J.W. Bridges, L.F. Chasseaud, eds.), pàg. 229-294. John Wiley & Sons Ltd., New York.

AHMED, A. E.; FAROOQUI, M. Y. H. «Comparative toxicities of aliphatic nitriles». *Toxicol. Lett.*, 1982, núm. 12, pàg. 157-163.

ANNIKO, M.; WERSÄLL, J. «Experimentally (Atoxil) induced ampullar degeneration and damage to the maculae utriculi». *Acta Oto-laryngol* (Stockh.), 1977, núm. 83, pàg. 429-440.

ARAN, J.M.; ERRE, J.P.; GUILHAUME, A.; AUROUSSEAU, C. «The comparative ototoxicities of gentamicin, tobramycin and dibekacin in the guinea pig». *Acta Oto-laryngol*. (Stockh.), 1982, núm. 390, pàg. 1-30.

B

BAIRD, R. A.; TORRES, M. A.; SCHUFF, N. R. «Hair cell regeneration in the bullfrog vestibular otolith organs following aminoglycoside toxicity. *Hearing Research*, 1993, núm. 65, pàg. 164-174.

BALABAN. «The use of selective silver degeneration stains in neurotoxicology. *The vulnerable brain and environmental risks*», A: *Malnutriton and Harzad Assessment* (Robert L. Isoocson and Karl F. Jesen. Eds.), 1992, núm. 1, pàg. 223-237. Plenum Press Ltd., New York.

BALBUENA, E.; LLORENS, J. «Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats». *Brain Res.*, 2001, núm. 904, pàg. 298-306.

BALBUENA, E.; LLORENS, J. «Comparison of cis-crotononitril effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers». *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, núm. 187, pàg. 89-100.

BANEA-MAYAMBU, J. P. «Dietary to exposure to cyanogens from cassava. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine» *cta Universitatis Upsaliensis*, 1997, núm. 689, pàg. 64.

BARONE JR., S.; HERR, D. W.; CROFTON, K. M. «Effects of 3,3'-iminodipropionitrile on the peripheral structures of the rat visual system». *Neurotoxicology*, 1995, núm. 16, pàg. 451-468.

BARROW, M. V.; SIMPSON, C. F.; MILLER, E. J. «Lathyrism: a review». *Q. Rev. Biol.* 1974, núm. 49, pàg. 101.

BENZ FW; NERLAND DE; CORBETT D; LI JY. «Biological markers of acute acrylonitrile intoxication in rats as a function of dose and time». *Fundamental and applied toxicology*, 1997, núm. 36, pàg. 141-148

BIGNAMI, A.; DAHL, D. «The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFAP) protein». *Exp. Eye Res.*, 1979, núm. 28, pàg. 63-69.

BOADAS-VAELLO P; JOVER ÈRIC; DíEZ-PADRISA, NÚRIA; BAYONA JOSEP M; LLORENS JORDI. «Differential role of CYP2E1-mediated metabolism in the lethal and vestibulotoxic effects of cis-crotononitrile in the mouse». *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2007, núm. 225, pàg. 310-317.

BOADAS-VAELLO, P.; RIERA, J.; LLORENS, J. «Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles». *Toxicological Sciences*, 2005, núm. 88, pàg. 456-466.

BOREK E; RITTENBERG D. «The metabolism of acetone by surviving rat liver». *J Biol Chem* 1969, núm. 179, pàg. 843-845.

BRADY, J. F.; LEE, M. J.; LI, M.; ISHIZAKI, H.; YANG, C. S. «Diethyl ether as a substrate for acetone/ethanol-inducible cytochrome P-450 and as an inducer for cytochrome(s) P-450». *Mol. Pharmacol.*, 1988, núm. 33, pàg. 148-154.

BROWN, A. «Slow axonal transport: stop and go traffic in the axon». *Nature Rev Mol. Cell. Biol.*, 2000, núm. 1, pàg. 153-156.

C

CADET, J. L. «The iminodipropionitrile (IDPN)-induced dyskinetic syndrome: behavioral and biochemical pharmacology». *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1989, núm. 13, pàg. 39-45.

CASAZZA JP; FU JL. «Measurement of acetol in serum». *Anal Biochem.*, 1985, núm. 148, pàg. 344-348.

CASAZZA, J. P.; FELVER, M. E.; VEECH, R. L. «The metabolism of acetone in rat». *J. Biol. Chem.* 1985, núm., 259, pàg. 231-236

CHINAKA S; TAKAYAMA N; MICHIGAMI Y, *et al.* «Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in blood by ion chromatography with fluorescence and ultraviolet detection». *J. Chromatogr B.*, 1998, núm. 713, pàg. 353-359.

CHEN L; LEE MJ; HONG J-Y; HUANG W-Q; WANG EJ; YANG CS. «Relationship between cytochrome P450 2E1 and acetone catabolism in rats as studied with diallyl sulfide as an inhibitor». *Biochem Pharmacol.*, 1994, núm. 48, pàg. 2199-2205.

CHOU, S. M.; HARTMANN, H. A. «Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. With a concept "Axostasis"». *Acta Neuropathol.*, 1964, núm. 3, pàg. 428-450.

CLARK, A. W.; GRIFFIN, J. W.; PRICE, D. L.. «The axonal pathology in chronic IDPN intoxication. *J. Neuropathol.*». *Exp. Neurol.*, 1980, núm. 39, pàg. 42-55.

CONWAY, EJ. «Microdiffusion analysis and volumetric error». 5th Revised Edition. 1962, London: Crosby Lockwood & Son.

COTANCHE, D. A. «Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma». *Hear. Res.*, 1987, núm. 30, pàg. 181-196.

COTANCHE, D. A. «Hair cell regeneration in the avian cochlea». *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1997, núm. 106, pàg. 9-15.

CROFTON, K. M.; JANSSEN, R.; PRAZMA, J.; PULVER, S.; BARONE, S. «The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage». *Hear. Res.*, 1994, núm. 80, pàg. 129-140.

CROFTON, K. M.; KNIGHT, T. «Auditory deficits and motor dysfunction following iminodipropionitrile administration in the rat». *Neurotoxicol. Teratol.*, 1993, núm. 13, pàg. 575-581.

CRUZ, RM; LAMBERT, PR; RUBEL, EW. «Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea». *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*, 1987, núm. 113, pàg. 1058-1062.

D

DASLER, W. «Isolation of toxic crystals from sweet peas (*L. odoratus*)». *Science*, 1954, núm. 120, pàg. 307-308.

DE GROOT, J.C.M.J.; HUIZING, E.H.; VELDMAN, J.E. «Early ultrastructural effects of gentamicin cochleotoxicity». *Acta Otolaryngol.* (Stockh.), 1991, núm. 111, pàg. 273-280.

DE OLMOS JD; BELTRAMINO CA; DE OLMOS-DE LORENZO S. «Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hyperoxia, and physical trauma». *Neurotoxicol Teratol.*, 1994, núm. 16, pàg. 545-561.

DE RAAD, S.; SZCZESNY, P. J.; MUNZ, K.; REMÉ, C. E. «Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Müller cells in correlation with photoreceptor damage». *Ophthalmic Res.*, 1996, núm. 28, pàg. 99-107.

DE VITO, S.C. «Designing safer nitriles». A: *Designing safer chemicals* (S. C. DeVito and R. L. Garrett, eds.), 1996, pàg. 194-223, American Chemical Society, Washington DC.

DE WAEGH, S. M.; LEE, V. M.Y.; BRADY, S. T. «Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells». *Cell*, 1992, núm. 68, pàg. 451-463.

DE ZEEUW. C.I.; SIMPSON, J.I.; HOOGENRAAD, C.C.; GALJART, N.; KOEKKOEK, S.K. & DELAY, J., PICHOT, P.; THUILLIER, J.; MARQUISET, J.P. «Action de l'amino-dipropionitrile sur le comportement moteur de la souris blanche. C. R.». *Soc. Biol.*, 1954, núm. 146, pàg. 533-534.

DE ZEEUW. C.I.; SIMPSON, J.I.; HOOGENRAAD, C.C.; GALJART, N.; KOEKKOEK, S.K. & RUIGROK, T.J. «Microcircuitry and function of the inferior olive». *Trends Neurosci.*, 1998, núm. 21, pàg. 391-400

DEMASTER E.G.; NAGASAWA H.T. «Disulfiram-induced acetonaemia in the rat and man». *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.*, 1977, núm. 18, pàg. 361-364.

DEMÊMES, D.; SANS, A. «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.*, 1985, núm. 18, pàg. 285-295.

DENLINGER, R. H.; ANTHONY, D. C.; AMARNATH, K.; AMARNATH, V.; GRAHAN, D. G. «Metabolism of 3,3'-iminodipropionitrilo and deuterium-substituted analogs: potential mechanism of detoxification and activation». *Toxicol. App. Pharmacol.*, 1994, núm. 124, pàg. 59-66.

DENLINGER, R. H.; ANTHONY, D. C.; AMARNATH, V.; GRAHAM, D. G. «Comparison of location, severity, and dose response of proximal lesions induced by 3,3'-iminodipropionitrilo and deuterium substituted analogs». *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1994, núm. 51, pàg. 569-576.

DESMADRYL, G.; DECHESNE, C. J. «Calretinin immunoreactivity in chinchilla and guinea pig vestibular end organs characterizes the calyx unit subpopulation». *Exp. Brain Res.*, 1992, núm. 89, pàg. 105-108.

E

EL HADRI, L.; CHANAS, B.I.; GHANAYEM, B.I. «Comparative metabolism of methacrylonitrile and acrylonitrile to cyanide using cytochrome P4502E1 and microsomal epoxide hydrolase-null mice». *Applied Pharmacol.*, 2005, núm. 205, pàg. 116-125.

ENGELHART, D. A. Part I. «Metabolic activation of cyclic tertiary amines». Part II. «Neurotoxic activation of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN)». Tesi doctoral, *Department of Chemistry*, 1994. Case Western Reserve University.

EYER, J.; MCLEAN, G.; LETERRIER, J.-F. «Effect of a single dose of β,β' -iminodipropionitrile in vivo on the properties of neurofilaments in vitro: comparison with the effect of iminodipropionitrile added directly to neurofilaments in vitro». *J. Neurochemistry*, 1989, núm. 52, pàg. 1759-1765.

F

FAROOQUI M.Y.H.; AHMED A.E. «In vivo interactions of acrylonitrile with macromolecules in rats». *Chemico-Biological Interactions*, 1983, núm. 47, pàg. 363-371.

FAROOQUI, M.Y.H; MUMTAZ, M.M. «Toxicology of methacrylonitrile». *Toxicology*, 1991, núm. 65, pàg. 239-250

FLORDELIZA Y.; BONDOC, ZIPING BAO; WEN-YU HU; FRANK J. GONZALEZ; YONGYU WANG; CHUNG S. YANG; JUN-YAN HONG. «Acetone Catabolism by Cytochrome P450 2E1: Studies with CYP2E1-Null Mice». *Biochemical Pharmacology*, 1999, núm. 58, pàg. 461-463

FORGACS, J. «Les altérations oculaires dans le lathyrisme expérimental dues à l'iminodipropionitrile (IDPN)». *Arch. Ophthalmol. Rev. Gen. Ophthalmol.*, 1960, núm. 20, pàg. 275-284.

FORGE, A.; LI, L. «Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia». *Hear. Res.*, 2000, núm. 139, pàg.97-115.

FORGE, A.; LI, L.; CORWIN, J.T.; NEVILL, G. «Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear». *Science*, 1993, núm. 259, pàg. 1616-1619.

FORGE, A.; LI, L.; NEVILL, G. «Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs». *J. Comp. Neurol.*, 1998, núm. 397, pàg. 69-88.

FORKERT, P.G.; REDZA, Z.M.; MANGOS, S.; PARK, S.S.; TAM, S.P. «Induction and regulation of CYP2E1 in murine liver after acute and chronic acetone administration». *Drug Metab. Dispos.*, 1994, núm. 22, pàg. 248-253.

FRANK J. GONZALEZ. «The Molecular Biology of Cytochrome P450s». *Pharmacological Reviews.*, 1998, núm. 40, pàg. 243-288.

FRITSCHI, J.A.; LAUTERBURG, T.; BURGUNDER, J.M. «Expression of neurotransmitter genes in motor regions of the dyskinetic rat after iminodipropionitrile». *Neurosci. Lett.*, 2003, núm. 347, pàg. 45-8.

FROINES, J. R., POSTLETHWAIT, E. M., LAFUENTE, E. J., LIU, W. C. V. «In vivo and in vitro release of cyanide from neurotoxic aminonitriles». *J. Toxicol. Environ. Health*, 1985, núm. 16, pàg. 449-460.

G

GAGNAIRE, F.; MARIGNAC, B.; BAN, M.; LANGLAIS, C. «The ototoxic effects induced in rats by treatment for 12 weeks with 2-butenenitrile, 3-butenenitrile and cis-2-pentenenitrile». *Pharmacol. Toxicol.*, 2001, núm. 88, pàg. 126-134.

GALLYAS F.; ZABORSKY L.; WOLFF JR. «Experiments on the mechanism of impregnation methods demonstrating axonal and terminal degeneration». *Stain Technol.*, 1980, núm. 55, pàg. 281-290

GENTER, M. B.; LLORENS, J.; O'CALLAGHAN, J. P.; PEELE, D. B.; MORGAN, K. T.; CROFTON, K. M. «Olfactory toxicity of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN) in the rat». *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1992, núm. 263, pàg. 1432-1439.

GENTER, M. B.; OWENS, D. M.; CARLONE, H. B.; CROFTON, K. M. «Characterization of olfactory deficits in the rat following administration of 2,6-dichlorobenzonitrile (dichlobenil), 3,3'-iminodipropionitrile, or methimazole». *Fund. Appl. Toxicol.*, 1996, núm. 29, pàg. 71-77.

GENTSCHKEV, T.; SOTELO, C. «Degenerative patterns in the ventral cochlear nucleus of the rat after primary deafferentation. An ultrastructural study». *Brain Res.*, 1973, núm. 62, pàg. 37-60.

GHANAYEM BI; BOOR PJ; AHMED AE. «Acrylonitrile-induced gastric-mucosal necrosis - role of gastric glutathione». *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 1985, núm. 232, pàg. 570-577

GIMENEZ-ROLDAN *et al.* «Lathyrism in Spain: progressive central nervous system deficits more than 45 years after onset?. *The grass pea and Lathyrism*». Proceedings of the second International *Lathyrus/Lathyrism* conference in Ethiopia, 1994, pàg. 10-25. Third World Medical Research Fundation, New York.

GOLD, B. G.; AUSTIN, D. R. «Regulation of aberrant neurofilament phosphorylation in neuronal perikarya.III. Alterations following single and continuous β,β' -iminodipropionitrile administrations». *Brain Res.*, 1991, núm. 563, pàg. 151-162.

GOLDBERG, J. M.; DESMADRYL, G.; BAIRD, R. A.; FERNÁNDEZ, C. «The vestibular nerve of the chinchilla. V. Relation between afferent discharge and peripheral innervation patterns in the utricular macula». *J. Neurophysiol.*, 1990, núm. 63, pàg. 791-804.

GOLDEY, E.S.; KEHN, L.S.; CROFTON, K.M. «The sensitivity to 3,3'-iminodipropionitrile differs for high-and midfrequency hearing loss in the developing rat». *Hear. Res.*, 1993, núm. 69, pàg. 221-228.

GOLDIN, A.; NOE, H. A.; LANDING, B. H.; SHAPIRO, D. M.; GOLDBERG, B. «A neurological syndrome induced by administration of some chlorinated tertiary amines». *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1948, núm. 94, pàg. 249-261.

GRIFFIN, J. W.; FAHNESTOCK, K. E.; PRICE, D. L.; CORK, L. C. «Cytoskeletal disorganization induced by local application of 3,3'-iminodipropionitrile and 2,5-hexanedione». *Annals of Neurology*, 1983a, núm. 14, pàg. 55-61.

GRIFFIN, J. W.; FAHNESTOCK, K. E.; PRICE, D. L.; HOFFMAN, P. N. «Microtubule-neurofilament segregation produced by β,β' -iminodipropionitrile: evidence for the association of fast axonal transport with microtubules». *J. Neurosci.*, 1983b, núm. 3, pàg. 557-566.

GRIFFIN, J. W.; HOFFMAN, P. N.; CLARK, A. W.; CARROLL, P. T.; PRICE, D. L. «Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment by 3,3'-iminodipropionitrile administration». *Science*, 1978, núm. 202, pàg. 633-635.

GRIFFIN, J. W.; PRICE, D. L. «Axonal transport in motor neuron pathology». A: *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (J. M., Andrews, R. T. Johnson, M. A., Brazier, eds.) núm. 19, pàg. 33-67, 1976. UCLA Forum in Medical Science, Academic Press, New York.

GRIFFIN, J. W.; PRICE, D. L. «Proximal axonopathies induced by toxic chemicals». A: *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (Spencer, P. S., Schaumburg, H. H., eds.), 1980, pàg. 161-178, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

GRIFFIN, J. W.; PRICE, D. L. «Demyelination in experimental IDPN and hexacarbon neuropathies: evidence for an axonal influence». *Lab. Invest.*, 1981a, núm. 45, pàg. 130-141.

GRIFFIN, J. W.; PRICE, D. L. «Schwann cell and glial responses in β,β' -iminodipropionitrile intoxication. I. Schwann cell and oligodendrocyte ingrowths». *J. Neurocytol.*, 1981b, núm. 10, pàg. 995-1007.

GROGAN, J.; DE VITO, S. C.; PEARLMAN, R. S.; KORZEKWA, K. R. «Modeling cyanide release from nitriles: prediction of cytochrome P450 mediated acute nitrile toxicity». *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, núm. 5, pàg. 548-552.

GRUENKE, L. D.; KONOPKA, K.; KOOP, D. R.; WASKELL, L. A. «Characterization of halothane oxidation by hepatic microsomes and purified cytochrome P-450 using a gas chromatographic mass spectrometric assay». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, núm. 246, pàg. 454-459.

H

HAQUE, A.; HOSSAIN, M.; LAMBEIN, F.; BELL, A. «Evidence of osteolathyrisms among patients suffering from neurolathyrisms in Bangladesh». *Natural Toxins*, 1997, núm. 5, pàg. 43-46.

HEATH, H.; RUTTER, A. C. «Retinal angiopathy in the imino-dipropionitrile-treated alloxan-diabetic rat. Brit». *J. Exp. Pathol.*, 1966, núm. 47, pàg. 116-120.

HERR, D.W.; KING, D.; BARONE JR.; CROFTON, K.M. «Alterations in flash evoked potentials (FEPs) in rats produced by 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN)». *Neurotoxicol. Teratol.*, 1995, núm. 17, pàg. 645-656.

HISANAGA, S.; KUSUBATA, M.; OKUMURA, E.; KISHIMOTO, T. «Phosphorylation of neurofilament H subunit at the tail domain by CDC2 kinase dissociates the association to microtubules». *J. Biol. Chem.*, 1991, núm. 266, pàg. 21798-21803.

HOOD, L.; CAMPBELL, J. H.; ELGIN, S. C. D. «The organization, expression, and evolution of antibody genes and other multigene families». *Annu. Rev. Genet.*, 1975, núm. 9, pàg. 305-353.

HUMPHREY, M. F.; MOORE, S. R. «Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions». *Glia*, 1996, núm. 16, pàg. 325-341.

HUNT, M. A.; MILLER, S. W.; NIELSON, H. C.; HORN, K. M. «Intratympanic injection of sodium arsenilate (atoxil) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats». *Behav. Neurosci.*, 1987, núm. 101, pàg. 427-428.

J

JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. «Benzene metabolism by ethanol-, acetone-, and benzene-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat and rabbit liver microsomes». *Cancer Res*, 1988, núm. 48, pàg. 5387-5390.

JACOBSON, A. R.; COFFIN, S. H.; SHEARSON, C. M.; SAYRE, L. M. « β,β' -iminodipropionitrile (IDPN) neurotoxicity: a mechanistic hypothesis for toxic activation». *Mol. Toxicol.*, 1987, núm. 1, pàg. 17-34.

JERMAK S, P. B. ; A. Padaruskas «Headspace single-drop microextraction with in-drop derivatization and capillary electrophoretic determination for free cyanide analysis». *Electrophoresis*, 2006, núm. 27, pàg. 4538-4544.

JULIEN, J. P.; MUHSHYNSKI, W. E. «Neurofilaments in health and disease». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1988, núm. 61, pàg. 1-23.

K

KAMPFL, A.; ZHAO, X.; WHITSON, J. S.; POSMANTUR, R.; DIXON, C. E.; YANG, K.; CLIFTON, G. L.; HAYES, R. L. «Calpain inhibitors protect against depolarization-induced neurofilament protein loss of septo-hippocampal neurons in culture». *Eur. J. Neurosci.*, 1996, núm. 8, pàg. 344-352.

KHANI, S. C.; ZAPHIROPOULOS, P. G.; FUJITA, V. S.; PORTER, T. D.; KOOK, D. R.; ; COON, M. J. «cDNA and derived amino acid sequence of ethanol-inducible rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a (P-450_{ALC})». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1987, pàg. 638-642.

KIM, S. G.; WILLIAMS, D. E.; SCHUETZ, E. G.; GUZELIAN, P. S.; NOVAK, R. F. (1988). «Pyridine induction of cytochrome P-450 in the rat: role of P-450 (alcohol-inducible form) in pyridine N-oxidation». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1988, núm. 246, pàg. 1175-1182.

KOMIYA, Y.; COOPER, N. A.; KIDMAN, A. D. «The long-term effects of a single injection of 3,3'-iminodipropionitrile on slow-axonal transport in the rat». *J. Biochem.*, 1986, núm. 100, pàg. 1241-1246.

KOOP DR «Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1». *FASEB J.*, 1992, núm. 6, pàg. 724-730.

KOOP, DR.; MORGAN, ET.; TARR, GE.; COON, MJ. «Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits». *J. Biol. Chem.*, 1982, núm. 257, pàg. 8472-8480.

KOOP, DR.; COON, M. J. «Purification of liver microsomal cytochrome P-450 isozymes 3a and 5 from imidazole-treated rabbits: evidence for the identity of isozyme 3a with the form obtained by ethanol treatment». *Mol. Pharmacol.*, 1984, núm. 25, pàg. 494-501.

KOOP, DR «Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a». *Mol. Pharmacol.*, 1986, núm. 29, pàg. 399-404.

KOOP, DR.; CASAZZA, JP. «Identification of ethanol-inducible P- 450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes». *J. Biol. Chem.*, 1985, núm. 260, pàg. 13607-13612.

L

LAMBEIN, F.; KHAN, J. K.; KUO, Y.H.; CAMPBELL, T.; BRIGGS, C. J. «Toxins in the seedlings of some varieties of grass pea (*Lathyrus sativus*)». *Natural Toxins*, 1993, núm. 1, pàg. 46-249.

LANG. «Über die Umwandlung des Acetonitrils und seiner Homologen im Tiekörper», *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1894, núm. 34, pàg. 247-258.

LEE SS; BUTERS JT; PINEAU T; FERNANDEZ-SALGUERO P ; GONZALES FJ «Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen». *J Biol Chem.*, 1996, núm. 271, pàg. 12063-12067.

LEE, K. S.; KIMURA, R. S. «Ultrastructural changes of the vestibular sensory organs after streptomycin application on the lateral canal». *Scanning Microscopy*, 1994, núm. 8, pàg. 107-124.

LEE, M. K.; CLEVELAND, D. W. «Neuronal intermediate filaments». *Annu. Rev. Neurosci.*, 1996, núm. 19, pàg. 187-217.

LENOIR, M.; PUEL, J.-L. «Dose-dependent changes in the rat cochlea following aminoglycoside intoxication. II. Histological study». *Hear. Res.*, 1987, núm. 26, pàg. 199-209.

LEWIS DVF; IOANNIDES C; PARKE DV «Interaction of a series of nitriles with the alcohol-inducible isoform of p450 - computer-analysis of structure-activity-relationships». *Xenobiotica*, 1994, núm. 24, pàg. 401-408

LEWIS, G. P.; ERICKSON, P. A.; GUÉRIN, C. J.; ANDERSON, D. H.; FISHER, S. K. «Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment». *Exp. Eye Res.*, 1989, núm. 49, pàg. 93-111.

LI, L.; FORGE, A. «Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula». *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1997, núm. 15, 433-446.

LINDSAY A.E.; GREENBAUM A.R.; O'HARE D. «Analytical techniques for cyanide in blood and published blood cyanide concentrations from healthy subjects and fire victims». *Anal. Chim. Acta.*, 2004, núm. 511, pàg. 185-195.

LL

LLORENS, J.; AGUILÓ, A.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E. «Behavioral disturbances and vestibular pathology following crotonitrile exposure in rats», *J. Periph. Nerv. Sys.*, 1998, núm. 3, pàg. 189-196.

LLORENS, J.; CROFTON, K. M.; O'CALLAGHAN, J. P. «Administration of 3,3'-iminodipropionitrile to the rat results in region-dependent damage to the central nervous system at levels above the brain stem». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993a, núm. 265, pàg. 1492-1498.

LLORENS, J.; DEMÊMES, D. «3,3'-Iminodipropionitrile induces neurofilament accumulations on the perikarya of rat vestibular ganglion neurons». *Brain Res.*, 1996, núm. 717, pàg. 118-126.

LLORENS, J.; DEMÊMES, D. «Hair cell degeneration resulting from 3,3'-iminodipropionitrile toxicity in the rat vestibular epithelia». *Hear. Res.*, 1994, núm. 76, pàg. 78-86.

LLORENS, J.; DEMÊMES, D.; SANS, A. «The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells». *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1993b, núm. 123, pàg. 199-210.

LLORENS, J.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E. «Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat». *Neurotoxicol. Teratol.*, 1997, núm. 19, pàg. 117-127.

M

MCKAY, G. F.; LALICH, J. J.; SCHILLING, E. D.; STRONG, F. M. «A crystalline factor from *Lathyrus odoratus*». *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, núm. 52, pàg. 313-322.

MIYASAKA, H.; OKABE, S.; ISHIGURO, K.; UCHIDA, T.; HIROKAWA, N. «Interaction of the tail domain of high molecular weight subunits of neurofilaments with the COOH-terminal region of tubulin and its regulation by tau protein kinase II». *J. Biol. Chem.* 1993, núm. 268, pàg. 22695-22702.

MORANDI, A., GAMBETTI, P., ARORA, P. K., SAYRE, L. M. «Mechanism of neurotoxic action of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN): M-hydroxylation enhances neurotoxic potency». *Brain Res.*, 1987, núm. 437, pàg. 69-76.

N

NERLAND DE; CAI J; PIERCE WM; BENZ FW «Covalent binding of acrylonitrile to specific rat liver glutathione S-transferases in vivo». *Chemical Research In Toxicology*, 2001, núm. 14, pàg. 799-806

NIXON, R. A. «Dynamic behaviour and organization of cytoskeletal proteins in neurons: reconciling old and new findings». *BioEssays*, 1998, núm. 20, pàg. 798-807.

NIXON, R. A.; PASKEVICH, P. A.; SIHAG, R. K.; THAYER, C. Y. «Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber». *J. Cell Biol.*, 1994, núm. 126, pàg. 1031-1046.

NOMOTO, N. «Inhibitory effect of free radical scavenger, MCI-186, in the increase of hydroxyl radical induced by iminodipropionitrile in rats». *J Neurol. Sci.*, 2004, núm. 219, pàg. 41-44.

O

O'DONOGHUE, J. L. «2,4-Hexadiene-1-nitrile». A: *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (P. S. Spencer, H. H. Schaumburg, eds) 2^oEdition, 2000, pàg..632, Oxford University Press, NY.

OHKAWA, H.; OHKAWA, R.; YAMAMOTO, I.; CASIDA, J. E. «Enzymic mechanisms and toxicological significance of hydrogen cyanide liberation from various organothiocyanates and organonitriles in mice and houseflies». *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1972, núm. 2, pàg. 95-112.

OLUWOLE, O. S. A.; ONABOLU, A. O.; LINK, H.; ROSLING, H. «Persistence of tropical ataxic neuropathy in a Nigerian community». *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2000, núm. 69, pàg. 96-101.

ORFILA, M. «Traité des poisons tirés des regnes minéral, végétal et animal, ou toxicologie générale, considérée sous les rapports de la physiologie, de la pathologie et de la médecine légale». *Crochard et Gabon Eds.*, 3^a ed. 1826, Paris, 720 pp.

OSSENKOPP, K. P.; PRKACIN, A.; HARGREAVES, E. L. «Sodium arsenilate-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system». *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1990, núm. 36, pàg. 875-881.

OSUNTOKUN, B. O. «An ataxic neuropathy in Nigeria, a clinical, biochemical and electrophysiological study». *Brain*, 1968, núm. 91, pàg. 215-248.

P

PANT, H. C.; VEERANA. «Neurofilament phosphorylation. Biochem». *Cell Biol.*, 1995, núm. 73, pàg. 575-592.

PAPASOZOMENOS, S. CH.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; GAMBETTI, P. «Reorganization of axoplasmic organelles following 3,3'-iminodipropionitrile administration». *J. Cell Biol.*, 1981, núm. 91, pàg. 866-870.

PARKER A.J.; CLARKE, K.A. «Gait topography in rat locomotion». *Physiol Behav.*, 1990, núm. 48, pàg. 41-47

PATTEN, C.J.; NING, S.M.; LU, A. YH.; YANG, CS. «Acetoneinducible cytochrome P-450: purification, catalytic activity, and interaction with cytochrome b₅». *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, núm. 251, pàg. 629-638.

PAXINOS G.; LAURA K.; KEN W.S. ASHWELL ; WATSON C. «Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain». Academic Press. 1999 (Harcourt Brace & Company eds). San Diego, USA.

PAXINOS G.; PASCAL CARRIVE; HONGQIN WANG; PING-YU WANG. «Chemoarchitectonic atlas of the rat brainstem», 1999 (Harcourt Brace & Company eds). San Diego, USA.

PERRONE-CAPANO, C.; PERNAS-ALONSO, R., DI PORZIO U. «Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration». *BioEssays*, 2001, núm. 23, pàg. 24-33.

PESTRONK, A., KEOGH, J. P., GRIFFIN, J. W. Dimethylaminopropionitrile. A: *Experimental and clinical neurotoxicology*, 1980 (P. S. Spencer, H. H. Schaumburg eds.) 422-429. Williams & Wilkins, Baltimore.

PORTER, J. D., VROCHOPOULOS, S.; MEYER, M. E. «Vestibular compensation in unilateral and bilateral labyrinthectomized rats». *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1992, núm. 18, pàg. 1049.

PRICE TD ; RITTENBERG D. «The metabolism of acetone. I. Gross aspects of catabolism and excretion». *J Biol Chem*, 1950, núm. 185, pàg. 449-459.

R

RAO, S. L. N.; MALHATI, K.; SARMA, P. S. «Lathyrism». *World Rev. Nutr. Diet*, 1969, núm. 10, pàg. 214.

ROY, S., COFFE, P., SMITH, G.; LIEM, R. K.; BRADY, S.T.; BLACK, M. M. «Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport». *J. Neurosci.*, 2000, núm. 20, pàg. 6849-6861.

RUBEL, E. W.; DEW, L. A.; ROBERSON, D. W. «Mammalian vestibular hair cell regeneration». *Science*, 1995, núm. 267, pàg. 701-703.

RYAN, D. E.; RAMANATHAN, L.; IIDA, S.; THOMAS, P. E.; HANIU, M.; SHIVELY, J. E.; LIEBER, C. S.; LEVIN, W. «Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid». *J. Biol. Chem.*, 1985, núm. 260, pàg. 6385-6393.

S

SANO A; TAKEZAWA M; TAKITANI S. «Spectrofluorimetric determination of cyanide in blood and urine with naphthalene-2,3-dialdehyde and taurine». *Anal. Chim. Acta.*, 1989, núm. 225, pàg. 351-358.

SANS, A.; CHAT, M. «Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography». *J. Comp. Neurol.*, 1982, núm. 206, pàg. 1-8.

SAYRE, L. M.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; GAMBETTI, P. «Pathogenesis of experimental giant neurofilamentous axonopathies: a unified hypothesis based on chemical modification of neurofilaments». *Brain Research Rev.*, 1985, n.um. 10, pàg. 60-83.

SCHILLING, E. D.; STRONG, F. M. (1954) Isolation, structure and synthesis of a Lathyrus factor from *L. odoratus*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, núm. 77, pàg. 2843-2848.

SCHMUED, L. C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER JR. «Fluoro-jade: a novel fluorochrome for the sensitive reliable histochemical localization of neuronal degeneration». *Brain Res.* 1997, núm. 51, pàg. 37-46.

SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. «Fluoro-jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration». *Toxicol. Pathol.*, 2000a, núm. 28, pàg. 91-99.

SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. «Fluoro-jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration». *Brain Res.*, 200b, núm. 874, pàg. 123-130.

SELYE, H. «Lathyrism». *Rev. Canad. Biol.*, 1957, núm. 16, pàg. 1-82.

SEOANE A.; APPS, R.; BALBUENA, E.; HERRERO, L.; LLORENS. «Neurotoxicology of *trans*-crotononitril: model of olive dysfunction?». *Soc Neurosci Abs.*, núm. 274.4, New Orleans

SEOANE A.; APPS, R.; BALBUENA, E.; HERRERO, L.; LLORENS «Differential effects of *trans*-crotononitrile and 3-acetilpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat». *European Journal of Neuroscience*, 2005, núm. 22, pàg. 880-894.

SEOANE, A.; DEMÊMES, D.; LLORENS, J. «Pathology of the rat vestibular sensory epithelia during subchronic 3,3'-iminodipropionitrile exposure: Hair cells may not be the primary target of toxicity». *Acta Neuropathol.*, 2001, núm. 102, pàg. 339-348.

SEOANE, A.; ESPEJO, M.; PALLÀS, M.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.,; AMBROSIO S.; LLORENS, J. «Degeneration and gliosis in rat retina and central nervous system following 3,3'-iminodipropionitrile exposure». *Brain Res.*, 1999, núm. 833, pàg. 258-271

SERA, K.; HARADA, Y.; TAGASHIRA, N.; SUZUKI, M.; HIRAKAWA, K.; OHYA, T. «Morphological changes in the vestibular epithelia and ganglion induced by ototoxic drug». *Scan. Microsc.*, 1987, núm. 1, pàg. 1191-1197.

SHOHAM, S.; CHEN, Y-C.; DEVIETTI, T.L. «Teitebaum Deafferentation of the vestibular organ: effects on atropine-resistant EEG in rats». *Psychobiology*, 1989, núm, 17, pàg. 307-314.

SILVER, E. H.; KUTTAB, S. H.; HASAN, T.; HASSAN, M. «Structural considerations in the metabolism of nitriles to cyanide in vivo». *Drug Metabol. Disposition*, 1982, núm. 10, pàg. 495-498.

SIMPSON, J.I.; WYLIE, D.R.; DE ZEEUW, C.I. «On climbing fiber signals and their consequence(s)». *Behav. Brain Sci.*, 1996, núm. 19, pàg. 384-398.

SLAGEL, D. E.; HARTMANN, H. A. «The distribution of neuroaxonal lesions in mice injected with iminodipropionitrile with special reference to the vestibular system». *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1965, núm. 24, pàg. 599-620.

SOBIN, A.; WERSÄLL, J. «A morphological study on vestibular sensory epithelia in a strain of the waltzing guinea pig». *Acta Oto-laryngol.* (Stockh), 1983, núm. 396, pàg. 1-32.

SOLER-MARTÍN C.; DíEZ-PADRISA N.; BOADAS-VAELLO P.; LLORENS J. «Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs and frogs». *Toxicological sciences*, 2007, núm. 96, pàg. 123-132

SONG, B. J.; MATSUNAGA, T.; HARDWICK, J. P.; PARK, S. S.; VEECH, R. L.; YANG, C. S., GELBOIN, H. V.; GONZALEZ, F. J. «Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat». *Mol. Endocrinol.*, 1987, núm. 1, pàg. 542-547, 1987.

SPENCER P. S.; ALBERT LUDOLPH; M.P. DWIVEDI, DWIJENDRA N.ROY, JACQUES HUGON ; H.H. SCHAUMBURG. «Lathyrism: evidence for role the neuroexcitatory aminoacid BOAA». *The Lancet*, 1986, núm. 2, pàg. 1066-7

SPENCER, P. S.; SCHAUMBURG H. H. «Experimental and Clinical Neurotoxicology». 2 ed. 2000, pàg. 1310, Oxford University Press, New York, Oxford.

SPENCER, P. S.; SCHAUMBURG, H. H. «Lathyrism: A neurotoxic disease. Neurobehav». *Toxicol. Teratol.*, 1983, núm. 5, pàg. 625-629.

STEBBINS, W. C.; MILLER, J. M.; JOHNSON, L. G.; HAWKINS, J. E. JR. «Ototoxic hearing loss and cochlear pathology in the monkey». *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1969, núm. 78, pàg. 598-602.

STOWELL A; JOHNSEN J; RIPEL A; MORLAND J «Disulfiraminduced acetonaemia». *Lancet*, núm. 1, pàg. 882-883.

SUMNER C. J.; TIMOTHY R. FENNELL, TIMOTHY A. MOORE, BRIAN CHANAS, FRANK GONZALEZ; BURHAN I.; GHANAYEM. «Role of Cytochrome P450 2E1 in the Metabolism of Acrylamide and Acrylonitrile in Mice». *Chem. Res. Toxicol.*, 1999, núm. 12, pàg. 1110-1116.

SWITZER III, R. C. «Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing». *Toxicol. Pathol.*, 2000, núm. 28, pàg. 70-83.

T

TAKUMIDA, M.; BAGGER-SJÖBÄCK, D.; HARADA, Y.; LIM, D.; WERSÄLL, J. «Sensory hair fusion and glycocalyx changes following gentamicin exposure in the guinea pig vestibular organs». *Acta Oto-laryngol.* (Stockh), 1989, núm. 107, pàg. 39-47.

TANII H; HASHIMOTO K. «Influence of ethanol on the in vivo and in vitro metabolism of nitriles in mice». *Archives of Toxicology.*, 1986, núm. 58, pàg. 171-176

TANII, H.; HASHIMOTO, K. «Studies on the mechanism of acute toxicity of nitriles in mice». *Arch. Toxicol.*, 1984, núm. 55, pàg. 47-54.

TANII, H.; HASHIMOTO, K. «Structure-acute toxicity relationship of dinitriles in mice». *Arch. Toxicol.*, 1985, núm. 57, pàg. 88-93.

TANII, H.; HAYASHI, M.; HASHIMOTO, K. «Nitrile-induced behavioral abnormalities in mice». *Neurotoxicology*, núm. 10, pàg. 157-166.

TANII, H.; HAYASHI, M.; HASHIMOTO, K. «Behavioral syndrome induced by allylnitrile, crotonitrile or 2-pentenenitrile in rats». *Neuropharmacol.*, 1991a, núm. 30, pàg. 887-892.

TANII, H.; KUROSAKA, Y.; HAYASHI, M.; HASHIMOTO, K. «Allylnitrile: a compound which induces long-term dyskinesia in mice following a single administration». *Exp. Neurol.*, 1989b, núm. 103, pàg. 64-67.

TANII, H.; ZANG, X.-P.; SAITO, N.; SAIJOH, K. «Involvement of GABA neurons in allylnitrile-induced dyskinesia». *Brain Res.*, 2000, núm. 887, pàg. 454-459

TANII H; TAKAYASU T; HIGASHI T; LENG S; SAIJOH K. «Allylnitrile: generation from cruciferous vegetables and behavioral effects on mice of repeated exposure». *Food Chem Toxicol.*, 2004, núm. 42, pàg. 453-8.

TASHALA-KATUMBAY D; BANEA-MAYAMBU JP; KAZADI-KAYEMBE T.; NUNGA-MATADI R.; BIKANGI-NKIABUNGU F.; EDELBOL EEG.OLFSSON K.; *et al.* «Neuroepidemiology of konzo. A spastic para/tetraparesis of acute onset in new area of the Democratic Republic of Congo». *Afer J Sci*, 2001, núm. 20, pàg. 8-12.

THOMAS, P. E.; BANDIERA, S.; MAINES, S. L.; RYAN, D. E.; LEVIN, W. «Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity N-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsomes». *Biochemistry*, 1987, núm. 26, pàg. 2280- 2289.

THUILLIER, J.; BURGER, A. «Contribution á l'étude du syndrome moteur provoqué chez la souris par l'amino-dipropionitrile (souris tournantes)». *Experientia*, 1954, núm. 10, pàg. 223-224.

TILSON, H. A. «Neurotoxicology in the 1990s». *Neurotoxicol. Teratol.*, 1990, núm. 12, pàg. 293-300.

TILSON, H. A. «New horizons: future directions in neurotoxicology». *Environ. Health Perspect.*, 2000, núm. 108, pàg. 439-441.

TILSON, H. A.; MITCHEL. C. L. «Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemicals on the nervous system». *Ann. Rev. Pharmacol.Toxicol.*, 1984, núm. 24, pàg. 425-450.

TYLLESKÄR, T.; BANEAMAYAMBU, J. P.; BIKANGI, N.; COOKE, R. D.; POULTER, N. H.; ROSLING, H. «Cassava cyanogens and konzo, an upper motoneuron disease found in Africa». *Lancet*, 1992, núm. 339, pàg. 208-211.

TYLLESKÄR, T.; H.T. RWIZA; M. BANEAMAYAMBU; W.P. HOWLETT; S-M. AQUILONIUS; L-A PERSON; H.ROSLING. «Similarities between konzo and lathyrism suggest a common pathogenetic mechanism». A: *The grass pea and Lathyrism. Proceedings of the second International Lathyrus/Lathyrism conference in Ethiopia*, 1994, pàg. 26-32. Third World Medical Research Foundation, New York.

V

VAN BLADEREN, P.J.; DELBRESSINE, L.P.; HOOGETERP, J.J.; BEAUMONT,A.H.; BREIMER, D.D.; SEUTTER-BERLAGE, F.; VAN DER GEN, A. «Formation of mercapturic acids from acrylonitrile, crotononitrile, and cinnamonitrile by direct conjugation and via an intermediate oxidation process». *Drug Metab. Dispos.*, 1981, núm. 9, pàg. 246-249.

VIVANCO F.; F. RAMOS; C. JIMENEZ-DÍAZ. «Determination of γ -aminobutyric acid and other free amino acids in whole brains of rats poisoned with β,β' iminodipropionitrile and α,γ -diaminobutyric acid with, or with-out administration of thyroxine». *Journal of Neurochemistry*, 1966, núm. 13, pàg. 1471-1467

W

WAKATA, N.; ARAKI, Y.; SUGIMOTO, H.; IGUCHI, H.; KINOSHITA, M. «IDPN-induced monoamine and hydroxyl radical changes in the rat brain». *Neurochem. Res.*, 2000, núm. 25, pàg. 401-404.

WANG, H.; CHANAS, B.; GHANAYEM, B.I.; «Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is essential for acrylonitrile metabolism to cyanide: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice». *Drug Metab. Dispos.*, 2002, núm. 30, pàg. 911-917.

WANG, L.; HO C. L.; SUN, D.; LIEM, R. K. H.; BROWN, A. «Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses». *Nature Cell Biol.*, 2000, núm. 2, pàg. 137-141.

WANG, M. K.; HEATH, H. «Effect of β,β' -iminodipropionitrile and related compounds on the electroretinogram and the retinal vascular system of the rat». *Exp. Eye Res.*, 1968, núm. 7, pàg. 56-61.

WARCHOL, M. E.; LAMBERT, P. R.; GOLDSTEIN, B. J.; FORGE, A.; CORWIN, J. T. «Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans». *Science*, 1993, núm. 259, pàg. 1619-1622.

WATSON, D. F.; FITTRO, K. P.; HOFFMAN, P. N.; GRIFFIN, J. W. «Phosphorylation-related immunoreactivity and the rate of transport of neurofilaments in chronic 2,5-hexanedione intoxication». *Brain Res.*, 1991, núm. 539, pàg. 103-109.

WENNGREN, B. -I.; ANNIKO, M. «Vestibular hair cell pathology in the Dancer mouse mutant». *Acta Oto-laryngol.* (Stockh), 1989, núm. 107, pàg. 182-190.

WERSÄLL, J.; BJORKROTH, B.; FLOCK, A.; LUNDQUIST, P-G. «Experiments on ototoxic effects of antibiotics». *Adv. Oto_rhino_Laryng.*, 1973, núm. 20, pàg. 14-41

WHITE, W. L. B.; ARIAS-GARZÓN, D. I.; MCMAHON, J. M.; SAYRE, R. T. «Cyanogenesis in cassava: the role of hydroxynitrile lyase in root cyanide production». *Plant Physiol.*, 1998, núm. 116, pàg. 1219-1225.

WILLHITE, C. C.; SMITH, R. P. «The role of cyanide liberation in the acute toxicity of aliphatic nitriles». *Toxicol. App. Pharmacol.*, 1981, núm. 59, pàg. 589-602.

WOLFF, G.; KUNZE, E.; RODDEN, A.; OEPEN, H. «Loss of auditory startle-reflex in the iminodipropionitrile (IDPN) treated rat». *Life Sci.*, 1977, núm. 20, pàg. 1163-1166.

WRIGHTON, SA.; THOMAS, PE.; MOLOWA, DT.; HANIU, M.; SHIVELY, JE.; MAINES, SL.; WATKINS, PB.; PARKER, G.; MENDEZ-PICON, G.; LEVIN, W.; GUZELIAN, PS. «Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase». *Biochemistry*, 1986, núm. 25, pàg. 6731-6735.

WRIGHTON, SA.; THOMAS, PE.; RYAN, DE.; LEVIN, W. «Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P- 450j». *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, núm. 258, pàg. 292-297.

Y

YADAV, S.; DHAWAN, A.; SINGH, R.L.; SETH, P.K.; PARMAR, D. «Expression of constitutive and inducible cytochrome P450 2E1 in rat brain». *Mol. Cell. Biochem.*, 2006, núm. 286, pàg. 171-180.

YAMASHITA, S. «Studies on the ocular changes of experimental lathyrism: Electron microscopic observations on epithelial, stromal and endothelial cells of β,β' -iminodipropionitrile (IDPN)-treated rat cornea». *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1973, núm. 77, pàg. 834-847 (en japonès).

YANG CS; YOO JSH; ISHIZAKI H; HONG J-Y. «Cytochrome P450IIE1: Roles in nitrosamine metabolism and mechanism of regulation». *Drug Metab Rev*, 1990, núm. 22, pàg. 147-159.

YOKOYAMA, K.; TSUKITA, S.; ISHIKAWA, H.; KUROKAWA, M. «Early changes in the neuronal cytoskeleton caused by 3,3'-iminodipropionitrile: selective impairment of neurofilament polypeptides». *Biomedical Res.*, 1980, núm. 1, pàg. 537-547.

Z

ZANG, X.P.; TANII, H.; KOBAYASHI, K.; HIGASHI, T.; OKA, R.; KOSHINO, Y.; SAIJOH, K. «Behavioral abnormalities and apoptotic changes in neurons in mice brain following a single administration of allylnitrile». *Arch. Toxicol.*, 1999, núm. 73, pàg. 22-32.

ZHU QZ; LINDENBAUM M; LEVAVASSEUR F; JACOMY H; JULIEN JP. «Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: Relief of

axonopathy resulting from the toxin β,β' -iminodipropionitrile». *J Cell Biol.*, 1998, núm. 143, pàg. 183-193.

URLgrafia

Biblioteca Universitat de Barcelona. URL: <<http://eclipsi.bib.ub.es/thac/cat20.htm>> [consulta: període setembre 2003 – desembre 2007].

Consorci de Biblioteques Universitàries de Catalunya. URL: <<http://www.cbuc.es/>> [consulta: període setembre 2003 – desembre 2007].

Criteris UB. URL: <<http://www.ub.es/criteris-cub/portada.php>> [consulta: període octubre 2007 – desembre 2007].

International Neurotoxicology Association. URL: <<http://www.neurotoxicology.org/>> [consulta: període maig 2005 – desembre 2007].

*ISI web of knowledge*SM [v3.0] URL: <<http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi>> [consulta: període setembre 2006 – desembre 2007].

Promenade autour de la Cochlée. URL: <<http://www.cochlee.org/>> [consulta: període octubre 2006 – desembre 2007].

PUBMED. URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>> [consulta: període setembre 2003 – desembre 2007].

Sociedad Española de Neurociencia. URL: <<http://www.senc.es/>> [consulta: període setembre 2005 – desembre 2007]

TERMCAT, Centre de terminologia. URL: <<http://www.termcat.cat/>> [consulta: període setembre 2003 – desembre 2007].

Universitat Oberta de Catalunya. URL: <<http://www.uoc.edu>>. Materials didàctics de les assignatures Psicofisiologia i Fonaments de Neurociència [consulta: període setembre 2005 – desembre 2007].

Web del Departament de Medi Ambient i Habitatge. URL: <<http://mediambient.gencat.net/cat/inici.jsp>>. [consulta: període setembre 2003 – desembre 2007].

VIII
ABREVIACIONES

Abreviacions

3AP: 3-acetilpiridina	GSH: glutatió
ABT: 1-aminobenzotriazol	GST: glutatió transferasa
ALN: al·lilnitril	HDN: 2,4-hexadienenitril
AME: atrofia muscular espinal	HO-IDPN: N-hidroxi-3,3'-minodipropionitril
ATC: àcid aminotiazolincarboxílic	IDPN: 3,3'-iminodipropionitril
BAPN: β-aminopropionitril	MAO: monoamina oxidasa
Beta-n: nucli β de l'oliva inferior	mEH: epòxid hidrolasa microsomal
CC: cèl·lula ciliada	MMAPN: monometilaminopropionitril
cDAO: part caudal del nucli accessori medial de l'oliva inferior	MT: microtúbuls
cèl.: cèl·lula	NF: neurofilaments
CEO: òxid cianoetilè	NFH: subunitat pesada dels neurofilaments
cis-CN: <i>cis</i> -crotononitril	NFL: subunitat lleugera dels neurofilaments
cMAO: part caudal del nucli accessori dorsal de l'oliva inferior	NFM: subunitat mitjana dels neurofilaments
CYP2E1: citocrom P4502E1	OI: oliva inferior
DAS: dial·lilsulfur	PO: nucli oliva principal de l'oliva inferior
DMAA: dimetilaminoacetoneitril	Ratolí CYP2E1^{-/-}: ratolí <i>knock-out</i> pel CYP2E1
DMABN: dimetilaminobutironitril	Ratolí mEH^{-/-}: ratolí <i>knock-out</i> per l'mEH
DMAPN: dimetilaminopropionitril	rDAO: part rostral del nucli accessori dorsal de l'oliva inferior
DMM: meat medial dorsal	rMAO: part rostral del nucli accessori medial de l'oliva inferior
DRG: gangli de l'arrel dorsal	SEM: microscòpia electrònica de rastreig
ECC: <i>excitation with choreiform and circling movements</i>	SNC: sistema nerviós central
ELA: esclerosi lateral amiotròfica	SNP: sistema nerviós perifèric
FI: filaments intermedis	SPME: <i>solid phase microextraction</i>
FMA: flavin monooxigenasa	TAN: neuropatia atàxica tropical
GC-NPD: cromatografia de gasos amb detector nitrogen-fòsfor	TMAPN: trimetilaminobutironitril
GFAP: proteïna àcida fibril·lar de la glia	trans-CN: <i>trans</i> -crotononitril
GLC: capa de cèl·lules ganglionars de la retina	VG: gangli vestibular
	β-ODAP: 3-N-oxalyl-L-2,3-diaminopropanoic