

Determinación inmunoquímica de autoinmunidad en oído interno en pacientes con diagnóstico de enfermedad de Ménière

Immunochemical determination of autoimmunity in the inner ear in patients with diagnosis of Ménière's disease

ALBERTO GÓMEZ, JULIO CÉSAR MARTÍNEZ, FERNANDO RIVADENEIRA, MARÍA ALEXANDRA VALDIVIESO, OSMARY HINCAPIÉ, PAOLA SÁNCHEZ, MARTÍN FERNÁNDEZ, JUAN MANUEL GARCÍA BOGOTÁ, D. C.

Resumen

Objetivo: determinar la presencia de anticuerpos contra antígenos de membrana coclear y proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) en enfermedad de Ménière.

Diseño: estudio observacional descriptivo y analítico.

Lugar: Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana y servicios de otorrinolaringología de los Hospitales San José, Militar Central, San Ignacio y de la Fundación Santa Fe de Bogotá.

Población: muestra de once pacientes con diagnóstico de enfermedad de Ménière y once controles sanos.

Intervenciones: se determinaron las concentraciones de anticuerpos específicos de la proteína de choque térmico (HSP70) en el suero de los pacientes antes de iniciado el tratamiento.

Mediciones principales: la concentración y especificidad de los anticuerpos anti-HSP70 fue determinada a través de las técnicas ELISA y *Western Blot*.

Resultados: en la prueba ELISA no se encontraron diferencias significativas entre las absorbancias de casos y controles ($p > 0.05$), en la prueba del *Western Blot* se encontró un índice de positividad del 90.9% (N=11) en los pacientes frente a un 9.1% (N=10) en los controles ($p < 0.001$).

Conclusión: las determinaciones de anticuerpos anti-HSP70 por medio de la técnica del *Western Blot* pueden utilizarse como apoyo diagnóstico en la enfermedad de Ménière, así como indicador para elegir una terapia inmunosupresora en los pacientes positivos para estos autoanticuerpos. (*Acta Med Colomb* 2003; 28: 101-107)

Palabras clave: autoinmunidad, enfermedad de Ménière, proteína HSP70.

Abstract

Aim: to determine the presence of antibodies specific of cochlear membrane antigens and of 70 kDa heat shock protein (HSP70) in Ménière disease.

Design: analytic and descriptive observational study.

Location: Institute of Human Genetics in the School of Medicine of the Javeriana Universidad and ENT units in the San José, Military and San Ignacio hospitals and Foundation Santa Fe in Bogotá.

Patients: 11 patients with diagnosis of Ménière disease and 11 controls.

Interventions: concentrations of antibodies specific of 70 kDa heat shock protein (HSP70) were determined in the serum of each patient before any treatment. For this purpose ELISA and western blot techniques were standardized.

Dr. Alberto Gómez: PhD, Profesor Asociado, Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana (P. U. J.); Drs. Julio César Martínez y Fernando Rivadeneira: Profesores Asistentes, Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, P. U. J.; Lic. María Alexandra Valdivieso: Rural Bacteriología, Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, P. U. J. y Clínica Metropolitana de Bucaramanga; Osmary Hincapié y Paola Sánchez: BLC, Facultad de Ciencias P. U. J.; Dr. Martín Fernández: Otorrinolaringólogo, Hospital de San José; Dr. Juan Manuel García: Otorrinolaringólogo, Jefe Sección de Otorrinolaringología, Fundación Santa Fe de Bogotá, Profesor Asociado, Facultad de Medicina Hospital de San José, Bogotá, D. C. Financiación: BR-1080, Banco de la República, Bogotá; PUJ-500, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Correspondencia: Dr. Alberto Gómez, PhD, Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Teléfono: 320-8320 (Ext. 2792) e-mail: agomez@javeriana.edu.co Recibido: 07/05/03. Aceptado: 09/07/03.

Results: we found a positivity index in the western blot analysis of patients of 90.9% (N=11) and of 9.1% (N=10) in controls ($p < 0.001$). ELISA tests were found to be non specific as the results of cases and controls were non statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusion: determinations of anti-HSP70 antibodies by western blot can be used as a complementary diagnostic test as well as an indicator for elective immunosuppressive therapy in positive patients. (*Acta Med Colomb* 2003; 28: 101-107)

Keywords: *autoimmunity, Ménière disease, HSP70.*

Introducción

La pérdida neurosensorial de la audición es el resultado de la disfunción o daño del oído interno (hipoacusia neurosensorial coclear) o el daño a nivel del octavo par o vía auditiva (hipoacusia neurosensorial retrococlear). Esta lesión puede ser causada por un gran número de condiciones: factores adquiridos, factores genéticos, infecciones y/o factores inmunológicos se encuentran entre los más importantes (1). La presbiacusia (pérdida de audición por envejecimiento) es la causa más común de la pérdida auditiva neurosensorial bilateral. A pesar de que se ha dilucidado en gran parte la fisiopatología de la mayoría de estos procesos hay varias formas de pérdida auditiva neurosensorial coclear cuya causa y patogénesis aún no son claras y en las cuales se sospecha una etiología autoinmune (2).

En este tipo de patologías otológicas, hay una alteración en el reconocimiento de lo propio, llevando a la producción de autoanticuerpos con la consecuente destrucción de tejidos, como es el caso de la enfermedad de Ménière y la pérdida progresiva idiopática neurosensorial (PNSHL) (3, 4). Enfermedades autoinmunes como la granulomatosis de Wegener, el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Cogan se asocian a síntomas cocleovestibulares y alteran la función inmunológica del saco endolinfático. De la misma manera los modelos animales de autoinmunidad sugieren una asociación con hidrops endolinfático (5,6). Estudios inmunohistoquímicos han mostrado la presencia de células inmunocompetentes y una interacción entre linfocitos y macrófagos en el saco endolinfático (7). Se ha observado que en los casos de Ménière y PNSHL el inicio temprano de tratamiento con esteroides puede llevar a la recuperación de la capacidad auditiva, o al menos, a detener la progresión del cuadro, lo que pone de manifiesto la importancia de un diagnóstico específico, rápido y eficaz (8).

La enfermedad de Ménière se caracteriza por una tríada de síntomas que incluyen: tinnitus, pérdida neurosensorial de la audición fluctuante, y ataques episódicos de vértigo, con o sin sensación de plenitud auditiva (oído tapado). Esta enfermedad se presenta más frecuentemente entre la tercera y la quinta década de la vida, aunque los adultos jóvenes y mayores no están exentos de padecerla (9). Su etiología es desconocida y puede ser bilateral en el 30% de los casos (10). El vértigo suele aparecer en episodios bien definidos, el cuadro a menudo es postrante, con frecuencia acompañado de náuseas y vómitos que persisten por un lapso prolongado; durante el ataque, siempre existe nistagmus vestibular

espontáneo (movimientos involuntarios del ojo). Entre los episodios se observa intolerancia al movimiento, vértigo relacionado con la posición, caídas y ataxia momentánea.

Hasta el momento no existe una prueba estandarizada y específica que determine la existencia de autoinmunidad en el oído, ni se poseen evidencias sólidas acerca de cuáles de estos pacientes se benefician de los tratamientos con esteroides. Así mismo, no hay un concepto claro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados que permitan generar nuevos enfoques terapéuticos. En general el diagnóstico de autoinmunidad se ha basado en la sospecha del médico tratante y en el uso de pruebas inespecíficas de laboratorio para la detección de autoinmunidad, tales como proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular (VSG), factor reumatoide, anticuerpos antinucleares (ANAS), inmunoglobulinas séricas o crioglobulinas y pruebas de proliferación linfocitaria (11). De esta manera, se hace necesario buscar un complemento diagnóstico en la detección de autoinmunidad en oído interno, que contribuya a dilucidar la eficacia del tratamiento con corticosteroides y el posible desarrollo de nuevas terapias inmunomoduladoras.

El objetivo de este estudio fue evaluar si las pruebas de ELISA y *Western blot* determinan de manera específica la presencia de anticuerpos contra antígenos de membrana coclear y proteína de choque térmico HSP70 en 11 pacientes con enfermedad de Ménière.

Material y métodos

Diseño de estudio

Estudio observacional que incluye componentes tanto descriptivos (serie de casos) como analíticos (casos y controles), enfocados en estandarizar una prueba diagnóstica de laboratorio para determinar la frecuencia de anticuerpos contra antígenos de oído interno en pacientes con enfermedad de Ménière.

Población de estudio

La población blanco fue la totalidad de pacientes con enfermedad de Ménière. La población de estudio fue una muestra por conveniencia de 11 pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Ménière, siguiendo los criterios de la Academia Americana de Otorrinolaringología (12). Los pacientes consultaron el servicio de otorrinolaringología en las diferentes instituciones, y fueron sometidos a los siguientes criterios de exclusión: mayor de 65 años, pérdi-

da auditiva menor a 24 horas, barotrauma, trauma craneoencefálico, trauma acústico y lesión penetrante en el oído. La información relevante de cada paciente fue consignada en un formato de recolección de muestras, previa firma del consentimiento informado.

Los controles negativos se tomaron de personas sin antecedentes de hipoacusia confirmados con audiometrías recientes. Así mismo, se excluyeron individuos con enfermedades que se asocian a niveles elevados de HSP70 como son quemaduras térmicas, diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, cáncer, colitis ulcerativa y cuadro febril (13).

Análisis estadístico

En el componente descriptivo del estudio se reportaron las características clínicas y demográficas de casos y controles en forma de media con desviación estándar o como proporciones según la naturaleza de la variable. Para comparar la proporción de individuos con reactividad entre el grupo de estudio y el grupo control se empleó la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates.

Técnica experimental

La respuesta autoinmune contra antígeno de oído interno, se valoró a través de las técnicas de ELISA y *Western blot* en pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Ménière y un grupo control. El suero de dichos pacientes se colocó frente a una proteína de choque térmico de extracto de tejido de riñón bovino con un peso molecular de 70kDa.

Obtención del extracto antigénico

La proteína alrededor de los 70kDa fue aislada de extracto renal bovino, previamente demostrado que contenía una proteína altamente análoga, desde el punto de vista inmunológico, a la proteína de 68kDa de membrana coclear humana y extracto de oído interno bovino (14, 15). La literatura demuestra que la proteína blanco fue separada por peso y carga realizando electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, y transferida a un papel de nitrocelulosa. La membrana con la proteína fue digerida con tripsina y los péptidos resultantes fueron separados por cromatografía líquida de alta resolución. La secuencia de la cadena de 22 aminoácidos de este péptido fue idéntica a la secuencia parcial de aminoácidos 213 a 234 de HSP70 bovina (Genbank accession N° U02891, National Center for Biotechnology Information):

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
Q  Q  I  F      Y  S  D  Q  G  V  L  I  Q  V  Y  G

```

La secuencia también fue idéntica a la correspondiente a los aminoácidos 424 a 445 de la cadena larga de HSP70 humana (Genbank accession N° MI 1717, National Center for Biotechnology Information).

Basados en estos estudios se decidió utilizar riñón bovino como antígeno, teniendo en cuenta la facilidad de extracción y la cantidad de proteína expresada.

Obtención de extracto de riñón bovino

El riñón bovino fue obtenido a partir de un novillo de dos años de edad, del frigorífico local, en condiciones de asepsia y empacado en hielo para ser transportado al laboratorio. Se retiró totalmente la grasa y el tejido conectivo del riñón, se realizaron dos lavados con PBS pH 7.4, se cortó en pequeñas piezas y se alicuotó en tubos que contenían 40 ml de PBS con PMSF y azida de sodio. El riñón fue homogenizado aproximadamente tres minutos y filtrado por gasa estéril. Se alicuotó en tubos nuevos de polipropileno de 50 ml y se realizó sonicación por 60 minutos, se centrifugó a 1550 g por 30 minutos a 4°C de temperatura (IEC Centra MP4R, International Equipment Company) y se filtró nuevamente por membranas de 2.5 μ m, 0.45 μ m y de 0.22 μ m respectivamente en condiciones de esterilidad.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica del extracto se efectuó por el método de Bradford, para conocer la concentración proteica total y determinar una concentración conocida para ser usada en el ELISA y el *Western blot*.

Elisa

Se sensibilizó la placa con 100 μ l del extracto de riñón bovino en una concentración de 1.0 μ g/ml de la proteína, diluido en buffer carbonato pH 9.2. Se incubó una hora a 37°C y toda la noche a 4°C. Se lavó dos veces con PBS IX pH 7.2 0.05% Tween. Se bloqueó con PBS IX pH 7.2, 5% leche descremada dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se adicionaron los sueros dilución 1/100 con PBS IX pH 7.2, 2.5% leche descremada. Se incubó una hora a temperatura ambiente en oscuridad y se realizaron seis lavados; se adicionó el conjugado (Anti IgG humana marcada con peroxidasa -*PO-) en dilución 1/10000. Se incubó una hora a temperatura ambiente en la oscuridad y se realizaron nuevamente los lavados, finalmente se incubó 30 minutos a temperatura ambiente el sustrato OPD (ortofenilendiamina) en oscuridad y se frenó la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N, para leerla en el lector de ELISA (Multiskan MCC/340P versión 2.33), a 492 nm contra blanco de sustrato.

Electroforesis SDS - PAGE

La electroforesis fue realizada de acuerdo con el método descrito por Laemmli (16). Gel de corrido al 10% (pH 8.8) y un gel de concentración al 4% (pH 6.8). Teniendo en cuenta la cuantificación de proteína se sembraron 30 μ g/20 μ L del extracto de riñón bovino suspendido en buffer de muestra; la solución resultante se calentó durante cinco minutos en ebullición para denaturar las proteínas. En algunos casos se añadieron estándares precoloreados de peso molecular CO-

nocido, se le aplicaron 60 mA y 120 voltios de corriente por gel hasta que hubiera un corrido que se detenga 1.5 cm sobre la base de las placas (aproximadamente tres horas). Las proteínas separadas se colorearon con azul brillante de Coomassie (R-250) y se decoloró con metanol (cuatro partes), ácido acético (una parte) y agua destilada (cinco partes) y se transfirió inmediatamente a la membrana de nitrocelulosa.

Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa

Después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia pH 8.3. Se le aplicó una corriente de 350 mA y 100 voltios por una hora y cinco minutos, durante el cual se realizó enfriamiento activo del buffer. Después de la transferencia, las membranas se colorearon con rojo de Ponceau por 15 minutos.

Western blot

Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas durante 30 minutos, con TBS 0.2% Tween y 5% leche descremada. El papel se incubó con el primer anticuerpo (suero dilución 1/5) una hora a temperatura ambiente en agitación constante, se lavó cinco veces por cinco minutos cada una, con buffer TBS 0.2% Tween 20. El papel se hizo reaccionar con una inmunoglobulina polivalente antihumana de cabra conjugada con peroxidasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) a una dilución 1:3000 por 50 minutos a temperatura ambiente, en agitación constante y en oscuridad. Se realizaron lavados. Las tiras se impregnaron con una solución reveladora para la peroxidasa (Luminol) durante un minuto y se realizó una impresión sobre una placa fotográfica especial para quimioluminiscencia. Se reveló con las técnicas convencionales de fotografía.

Resultados

En la Tabla 1 se presentan las características clínicas de los 11 pacientes con enfermedad de Ménière. Los controles fueron constituidos por seis mujeres y cinco hombres con edad promedio de 23 años. La concentración proteica del extracto de riñon osciló entre 7.200 µg/ml y 7825 µg/ml. En la electroforesis de este extracto se identificaron diferentes bandas de peso molecular, observándose la presen-

Tabla 2. Comparación de promedios de absorbancia del ELISA entre casos y controles con el extracto de riñon bovino y PBS.

Pacientes n= 11	Extracto ELISA-1	Extracto ELISA-2	Extracto ELISA-3	Extracto ELISA-4
Casos				
Media	.713182	.763045	.364500	.365545
Desviación estándar	.158865	.209486	7.875E-02	7.862E-02
Controles				
Media	.689182	.705182	.304364	.305182
Desviación estándar	.362113	.429012	.256131	.256489
Total				
Media	.701182	.734114	.334432	.335364
Desviación estándar	.273148	.330784	.187456	.187682
(p>0.05)				
Pacientes n= 11	PBS ELISA-1	PBS ELISA-2	PBS ELISA-3	PBS ELISA-4
Casos				
Media	.481364	.472545	5.914E-02	6.086E-02
Desviación estándar	.123458	.172407	2.832E-02	2.829E-02
Controles				
Media	.390182	.335273	4.195E-02	4.409E-02
Desviación estándar	.210183	.198395	3.297E-02	3.277E-02
Total				
Media	.435773	.403909	5.055E-02	5.248E-02
Desviación estándar	.174563	.194506	3.126E-02	3.108E-02
(p>0.05)				

Tabla 1. Características clínicas de los 11 pacientes con enfermedad de Ménière.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Característica											
Sexo	M	F	M	F	F	F	M	F	F	F	M
Edad	39	-	44	69	46	30	42	46	33	35	68
Bilateralidad	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO
Otros antecedentes de autoinmunidad	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
VSG mm/hr	8	11	1	17	8	2	2	27	7	16	21
Proteína C reactiva	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
R.A test	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
ANAS	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Western blot	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
Prueba confirmatoria (Oto-Blot)	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
VSG: velocidad de sedimentación globular; R.A: artritis reumatoidea; ANAS: anticuerpos antinucleares; M: masculino; F: femenino; Pos: positivo; Neg: negativo											

Tabla 3. Comparación de promedios de absorbancia entre casos y controles con control de ruido de fondo.

	n=11			
Pacientes	ELISA-1	ELISA-2	ELISA-3	ELISA-4
Casos				
Media	.231818	.290500	.305364	.304682
Desviación estándar	.101679	.163665	7.19E-02	7.19E-02
Controles				
Media	.299000	.369909	.262409	.261091
Desviación estándar	.191478	.274679	.233856	.234368
Total				
Media	.265409	.330205	.283886	.282886
Desviación estándar	.153506	.224354	.170251	.170612

(p>0.05)

Tabla 4. Comparación del promedio de los cuatro ELISA con control de ruido de fondo.

Pacientes	Media	Desviación estándar
Casos	.283091	8.10E-02
Controles	.298102	.218128
Total	.290597	.160741

(p>0.05)

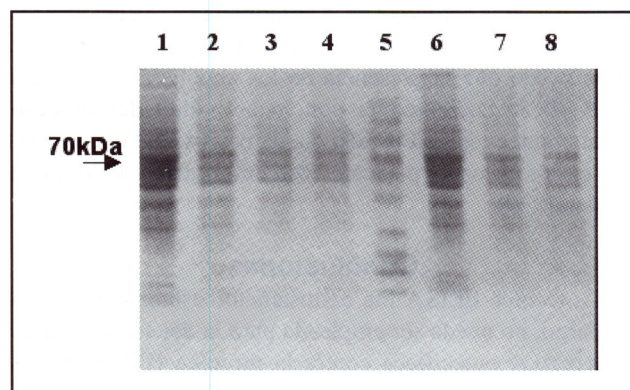


Figura 1. Electroforesis sds page. En las líneas 1 y 6 el extracto se encuentra en una dilución de 3/2, en las líneas 2 y 7 en dilución 3/4, en las 3 y 8 en dilución 1 / 8 y en la línea 4 en dilución 1/10. En la línea 5 se encuentra el marcador de peso molecular que contiene las proteínas de 220kDa, 130kDa, 90kDa, 70kDa, 60kDa, 40kDa, 30kDa, 20kDa, 19kDa, y 10kDa.

cia de la banda de 70 kDa, proteína de interés para el presente estudio. Las bandas más comunes en el extracto fueron las de 70 kDa, 60 kDa, 40 kDa y 30 kDa. (Figura 1).

Los promedios de absorbancia del ELISA con extracto de riñón bovino de casos y controles se presentan en la Tabla 2. El control de ruido de fondo no modificó de manera importante los promedios de absorbancia entre casos y controles (Tabla 3). Así mismo los promedios de las cuatro pruebas ELISA con control de ruido de fondo no mostraron variaciones. (Tabla 4).

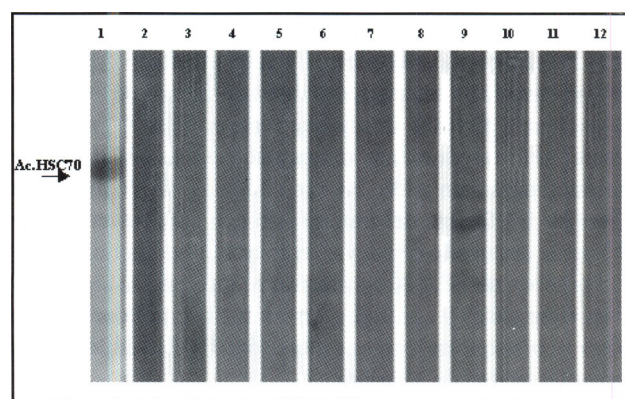


Figura 2. Western blot de grupo control. La línea 1 corresponde al anticuerpo policlonal HSC70. Las líneas 2 a la 12 corresponden a los sueros del grupo control. En la línea 9 se observa una banda a la misma altura del control de HSC70 y dos más de bajo peso molecular.

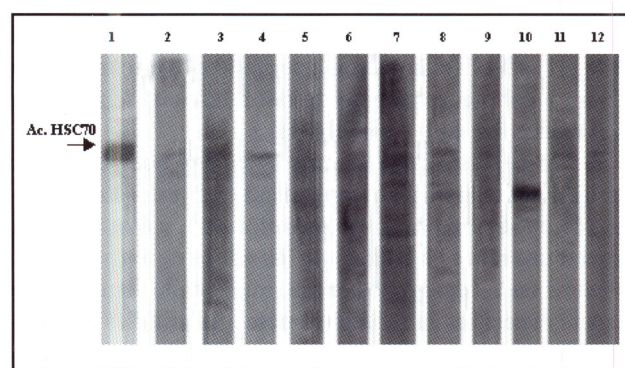


Figura 3. La línea 1 corresponde al anticuerpo policlonal HSC70. Las líneas 2 a la 12 corresponden a la reacción de los sueros de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Ménière. La línea 5 se observa negativa para la proteína HSC70, en las líneas 6 y 7, aunque tienen mucho ruido de fondo, se pueden observar las bandas a la altura de la HSC70, y en la línea 10 se ve la presencia de la banda de 70kDa muy leve y una marcada banda de un peso molecular más bajo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones de absorbancia de casos y controles en las pruebas ELISA (p>0.05).

Western blot

Múltiples ensayos de esta técnica fueron realizados a los pacientes positivos y los controles mostrando siempre resultados consistentes. El control positivo se observó claramente, indicando ausencia de errores en la técnica o reactivos defectuosos. El índice de positividad en la población enferma fue de 90.9% frente a un 9.1% en los controles (p<0.001). La razón de riesgo fue de 100, con un intervalo de confianza del 95% de 5.5 a 1830.5. Este Western blot demuestra la alta fidelidad de la prueba entre los pacientes con la enfermedad y la existencia de una fuerte banda en la región alrededor de peso molecular de 70kDa. (Figuras 2 y 3).

Discusión

Este estudio buscó evaluar una herramienta de diagnóstico, basada en las pruebas de ELISA y Western blot, para

el estudio de hipoacusias neurosensoriales, concretamente en la enfermedad de Ménière. La determinación específica de la presencia de anticuerpos contra antígenos de membrana coclear y proteína de choque térmico HSP70 permiten ofrecer un complemento diagnóstico en la detección de autoinmunidad en oído interno, además de contribuir a dilucidar la eficacia del tratamiento con corticosteroides y el posible desarrollo de nuevas terapias inmunomoduladoras. Las pruebas de ELISA no mostraron diferencias significativas entre casos y controles, en contraste con la prueba de *Western blot* que mostró una alta especificidad en los casos con enfermedad de Ménière.

En 1990, estudios realizados por Harris y Sharp (17) demostraron la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes con enfermedad de Ménière, los cuales reaccionaron contra la proteína de 68kDa expresada en la membrana coclear, la cual es homóloga en un 99% a la expresada en riñón como lo demostraron Bloch y colaboradores en 1995 (18, 19). Esta homología permitió que este trabajo se llevara a cabo con extracto de riñón bovino, debido a su fácil manipulación y consecución.

Desde la perspectiva inmunológica hay que considerar también que el extracto crudo de riñón expresa otras proteínas (como se observa en la electroforesis), y éstas podrían generar una reacción cruzada en los sueros de los pacientes, así como en los del grupo control, impidiendo visualizar de manera específica la reacción frente a la proteína en estudio. De esta manera, la presencia de una alta reactividad de los sueros control puede ser explicada si se toma en cuenta que en un extracto crudo de riñón se encuentran diferentes proteínas expresadas en gran cantidad. Otra posible causa del aumento del ruido de fondo, es el consumo de productos lácteos y carnes por parte de los sujetos de estudio, lo cual puede llevar a la producción de anticuerpos contra algunas proteínas expresadas en el riñón bovino. Esto podría explicar los resultados negativos en las pruebas ELISA; sin embargo, también hay que considerar que dado el bajo tamaño de muestra, no se puede descartar la posibilidad de estar cometiendo un error tipo II o b, es decir, de no tener un instrumento con suficiente poder para encontrar diferencias significativas. Por lo tanto, no hay evidencia suficiente para emplear el ELISA como prueba diagnóstica de rutina y se debe evaluar en un estudio con mayor tamaño de muestra la precisión, sensibilidad y especificidad de esta prueba.

Las pruebas de *Western blot* fueron practicadas con el fin de demostrar el reconocimiento específico de los anticuerpos presentes en el suero contra la proteína HSP70. La reacción positiva de la proteína HSP70 en el 90.9% de los casos en el *Western blot* es indicio claro de un compromiso autoinmune en la enfermedad de Ménière. Sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de muestra para obtener y definir mejor las características operativas de sensibilidad y especificidad del *Western blot* como prueba diagnóstica de la enfermedad de Ménière. De la misma

manera, es importante determinar como prueba diagnóstica complementaria en pacientes con otras entidades para determinar la presencia de autoinmunidad del oído interno.

Desde la perspectiva fisiopatológica, no es claro el mecanismo por el cual se inicia el daño en el oído interno, y los hallazgos serológicos positivos se deben considerar como indicadores del estado degenerativo de este órgano y no como indicadores de los mecanismos que inician el proceso (20). Los anticuerpos elevados pueden ser un epifenómeno como sucede, por ejemplo, con la eritrosedimentación elevada y no ser la causa de un daño órgano-específico, lo cual explicaría el bajo porcentaje de positividad en el análisis de la respuesta autoinmune obtenido en otros estudios (21). Hasta el momento, cuatro teorías se han propuesto para explicar el origen del daño coclear:

1) Liberación de citoquinas inmunoestimulantes por daño contiguo al oído interno, 2) reacciones cruzadas de antígenos cocleares con antígenos microbianos, 3) intolerancia inmunológica en zonas de este órgano que pueden, como en la cámara ocular, tener privilegio inmunológico y 4) factores genéticos, pues la autoinmunidad se ha asociado, en algunas poblaciones, a la presencia de algunos genes HLA en los individuos afectados (21).

Desde el punto de vista clínico, el contar con una prueba diagnóstica para el estudio de pacientes con hipoacusia neurosensorial coclear asociada a autoinmunidad, permitirá confirmar la actividad de la enfermedad y seleccionar los mejores pacientes para terapia inmunosupresora, pues está demostrado que la presencia de los anticuerpos contra la HSP 70 se correlaciona con la actividad del proceso autoinmune, con una incidencia de positividad que es mayor en los casos de pacientes con enfermedad de Ménière bilateral (22).

Conclusiones

La técnica ELISA fue exitosamente estandarizada; sin embargo, no puede ser empleada para la determinación de anticuerpos específicos contra la proteína HSP70 en los pacientes con enfermedad de Ménière, debido a una potencial reacción cruzada encontrada en el grupo control. El *Western blot* puso en evidencia la unión específica a la proteína HSP70 en contacto con el suero de los pacientes, confirmando la presencia de los anticuerpos correspondientes, demostrando así un compromiso autoinmune en la enfermedad de Ménière. Restan por establecer las características operativas (sensibilidad, especificidad y valores predictivos) del ensayo *Western blot* como prueba diagnóstica de la enfermedad de Ménière y otras entidades que cursan con autoinmunidad en el oído interno.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo brindado por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, el Hospital Universitario San José, la Clínica de la Policía y la Fundación Santa Fe de Bogotá, así como a los doctores José Alberto Prieto, del Hospital Militar Central, Diana Quijano y Vicente Rodríguez, del Hospital San Ignacio, y José San Martín, de la Universidad de Harvard.

Referencias

1. **Moscicki RA, San Martín JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB, Bloch KJ.** Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. *JAMA* 1994; **272**: 611-616.
2. **Alleman AM, Dornhoffer JL, Arenberg IK, Walker PD.** Demonstration of autoantibodies to the endolymphatic sac in Ménière's disease. *Laryngoscope* 1997; **107**: 211-215.
3. **Gottschlich S, Billings PB, Keithly EM, Weisman MH, Harris JP.** Assessment of serum antibodies in patients with rapidly progressive hearing loss and Ménière's Disease. *Laryngoscope* 1995; **105**: 1347-1352.
4. **McCabe BF.** Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol* 1979; **88**: 585-589.
5. **Tomiyama S, Harris JP.** The endolymphatic sac: its importance in inner ear immune response. *Laryngoscope* 1986; **6**: 685-691
6. **Harris JP.** Experimental autoimmune sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1987; **97**: 63-76.
7. **Arnold W, Pfaltz R, Alternatt HJ.** Evidence of serum antibodies against inner ear tissues in the blood of patients with certain sensorineural hearing disorder *Acta otolaryngol (Stockh)* 1985; **99**: 437-44
8. **Harris JP, Ryan AF.** Fundamental immune mechanisms of the brain and inner ear: normal and pathologic function. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; **112**: 639-653.
9. **García J.** Fundamentos de otorrinolaringología y patología cervicofacial. Editorial Salvat, Bogotá, 1994.
10. **Atlas DM, Chai F, Boncasto L.** Ménière's Disease. Evidence of an Immune Process. *Am Journal Otol* 1998; **19**: 628-631.
11. **García JM.** Vértigo y alteraciones del equilibrio. En: *Fundamentos de otorrinolaringología y patología cervicofacial*. García J (ed), pp 119-150, Salvat Editores, Bogotá 1994.
12. **Pearson BW, Brackmann DE.** Committee on hearing and equilibrium guideline for reporting treatment results in Ménière's Disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985; **93**: 579-581
13. **Derebery MJ.** Prevalence of heat shock protein in patients with Ménière's Disease and allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; **126**: 677-682
14. **Rauch SD, San Martín JE, Moscicki RA.** Bovine temporal bones as a source of inner ear antigen. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; **101**: 688-690.
15. **Shin S, Billings PB, Keithly EM, Harris JP.** Comparison of anti-heat shock protein 70 and anti-68kDa inner ear protein in the sera of patients with Ménière's disease. *Laryngoscope* 1997; **107**: 222-227.
16. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685
17. **Harris JP, Sharp PA.** Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990; **100**: 516-524.
18. **Bloch DB, San Martín JE, Rauch SD, Moscicki RA.** The target antibody in the serum of patients with idiopathic, progressive, bilateral sensorineural hearing loss is the heat shock protein 70 (HSP70). *J Allergy Clin Immunol* 1995; **95**: 149.
19. **Bloch DB, San Martín JE, Rauch SD, Moscicki RA, Bloch KJ** Serum antibodies to heat shock protein in sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; **121**: 1167-1171.
20. **Ruckenstein MJ, Prasthoffer A, Bigelow, et al.** Immunologic and serologic testing in patients with Ménière's Disease. *Otol Neurotol* 2002; **23**: 517-521.
21. **Hain TC.** What is autoimmune inner ear disease? [Http://www.american-hearing.org/name/autoimmune.html](http://www.american-hearing.org/name/autoimmune.html), 2002.
22. **García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA.** Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope* 2002; **112**: 304-309.