

**BASES INMUNOGENÉTICAS DE LA
ENFERMEDAD DE MENIERE:
Búsqueda de marcadores genéticos**



IRENE GÁZQUEZ PÉREZ
Tesis doctoral. 2012.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Irene Gázquez Pérez
D.L.: GR 334-2013
ISBN: 978-84-9028-359-2

Tesis doctoral presentada para obtener el título de Doctor por la Universidad de Granada:

BASES INMUNOGENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE MENIERE: Búsqueda de marcadores genéticos.

Irene Gázquez Pérez

Directores:

José Antonio López Escámez
Miguel Ángel López Nevot



Programa de Doctorado en Inmunología y Biomedicina.
Dpto. de Bioquímica y biología Molecular e Inmunología.
Universidad de Granada

**Octubre 2012
GRANADA**



Universidad de Granada



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-
JUNTA DE ANDALUCÍA DE GENÓMICA E
INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

José Antonio López Escámez, Doctor en Medicina y Cirugía; Facultativo Especialista de Área del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital de Poniente; Investigador Asociado del área de Variabilidad del ADN humano en el Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) en Granada.

Certifica que:

Irene Gázquez Pérez, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado la Tesis Doctoral “BASES INMUNOGENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE MENIERE: Búsqueda de marcadores genéticos” en el laboratorio de HLA del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y en el Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) para aspirar al grado de Doctora en Biología, reuniendo las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Granada, a 13 de Julio de 2012.

Dr. José Antonio López Escámez



Universidad de Granada



Miguel Ángel López Nevot, Doctor en Medicina y Cirugía; Facultativo Especialista de Área del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves; Profesor Asociado del Área de Inmunología en la Universidad de Granada.

Certifican que:

Irene Gázquez Pérez, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado la Tesis Doctoral “BASES INMUNOGENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE MENIERE: Búsqueda de marcadores genéticos” en el laboratorio de HLA del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y en el Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) para aspirar al grado de Doctora en Biología, reuniendo las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Granada, a 13 de Julio de 2012.

Dr. Miguel Ángel López Nevot

«Un hombre joven y sano se siente atacado repentinamente y sin causa aparente de vértigo, malestar y náuseas; un miedo indescriptible hace que desaparezcan sus fuerzas... Frecuentemente, el enfermo pierde la audición, vacila y cae al suelo sin que pueda volver a levantarse...»

Prosper Ménière. (Enero de 1861, París)

“Uno no se da cuenta de lo que ha hecho, sólo puede ver lo que queda por hacer”.

Marie Curie, (Polonia 1867 – Francia 1934)

Agradecimientos:

A mis directores, José Antonio López Escámez y Miguel Ángel López Nevot. Gracias, porque sin vuestra oportunidad, sin vuestras ideas, vuestras horas de trabajo, vuestra disponibilidad y accesibilidad no hubiera podido haber realizado esta tesis.

A J. Manuel Espinosa, Alicia López Nevot, Herminio Pérez Garrigues, Ismael Arán, Gabriel Trinidad, Nicolás Pérez, Manuel Gómez, Cristóbal Zapata, Andrés Soto, Sofía Santos, Ángel Batuecas y Paz Pérez, que colaboraron en los trabajos con el envío de muestras y con sus conocimientos y amplia experiencia. Y a todos los pacientes con enfermedad de Meniere por su colaboración.

A mis profesores de la Universidad de Granada, con especial mención a M^a Celia Velez Fernández por su apoyo, a Esther Viseras Alarcón por su dedicación hacia los alumnos, a Víctor Arce Fraile, quien me hizo comprender el funcionamiento del ADN y a Regino Zamora, quien me transmitió su entusiasmo por querer solucionar cualquier problema que plantea la biología.

A mis compañeros de GenyO: LuisJa, Sara y Belén que me ayudaron con cualquier problema en el laboratorio; a Marta Alarcón Riquelme, por toda su ayuda; a todos los compañeros de Administración; a mis vecinos de sala de trabajo: Andrés y Ángela, porque las tardes solitarias en GenyO fueron menos solitarias gracias a vuestra compañía; a Ruth, por compartir ratitos de desahogo necesarios para poder continuar (mucho ánimo y suerte a ti también); y principalmente a Tere, a quien le deseo un futuro prometedor dentro de la investigación.

A mis compañeras del hospital Virgen de las Nieves: Alba, Eva, Toñi y Elvira, por vuestra asesoría en Inmunología (y por leeros y corregir esta tesis), además de por enseñarme provechosas manías de laboratorio y hacerme tan fácil el trabajo. Por esos desayunos tan amenos y por esas cenas de las que nos arrepentimos al día siguiente. Y, lo más importante, por demostrarme que estáis ahí cuando os necesito por muy importante o absurdo que sea el problema. Os quiero y echo de menos, a vosotras y a ese laboratorio de Inmunología donde es una locura trabajar, pero una locura muy agradable.

A mis excompañeros del hospital de Poniente, que me hicieron tan fácil comenzar una nueva etapa. Concretamente a Raúl, David, Omar, Lourdes, Cris

y, con especial cariño, a Irene, de los que tuve y tengo la suerte de seguir aprendiendo y seguir disfrutando de su compañía de vez en cuando.

A Lu, Sara y Sita, porque sin vosotras esta tesis no hubiera empezado y, lo que es más importante, nunca hubiera terminado. Por demostrarme que es más efectiva la cooperación que la competición, porque empezamos formando un equipo de estudio y ahora somos un equipo de vida. Estoy orgullosísima de vosotras y os echo mucho de menos, todo lo demás menos mal que lo sabéis porque me faltarían páginas para escribíroslo.

También a Javi, mi padrino biólogo, gracias por guiarme muchas veces durante la carrera. Es gratificante saber que siempre podemos compartir un rato para recargar fuerzas.

No me olvido tampoco de Auri, ni de Fermina, con quienes disfruté tantos momentos y compartí tantos apuntes.

A Marikilla, M^a Carmen, María del Mar, Elena, Irene, María, Laura, Candela, Chica, Aldara, Yajaira, Emilio, Jose y Raúl. Soy la más pequeña de un grupo de grandes personas y me ayudáis diariamente con vuestro apoyo, vuestra madurez y con vuestra asesoría vital. Os quiero demasiado porque me enseñasteis a soñar y a luchar por ello en aquella C/Jaén n^o7, y porque sois lo más dulce que ha nacido del mar y endulzáis mi vida, entre otras cosas.

Gracias también a Sergio por su ayuda y paciencia, y por darme la oportunidad de presumir de su arte.

Y de todos, todos, sobre todo a Raúl, compañero de vida y mejor amigo, por conocer el secreto de la felicidad y explicármelo cada mañana, además de por enseñarme a reducir los problemas a simplemente lo importante.

El mundo tiene la suerte de que existas..., y yo también.

A mis abuelos, tíos, hermana y hermano, por vuestro cariño incondicional y eterno y por ser ejemplo de constancia, trabajo y esfuerzo. A mi padre, por enseñarnos, en cualquier contexto de la vida, que para escribir una palabra antes se han tenido que leer unas cinco mil. Y a mi madre, en especial, por su inagotable amor y lucha por todos nosotros. Os quiero mucho.

Índice

ABREVIATURAS	17
RESUMEN	21
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	25
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	25
2. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD.....	30
3. EPIDEMIOLOGIA.....	31
4. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	32
5. DIAGNÓSTICO.....	33
6. TRATAMIENTO.....	35
7. ETIOLOGIA Y PATOGENIA.....	42
8. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA.....	59
9. VARIANTES POLIMORFICAS.....	61
<i>Polimorfismos de un único nucleótido (SNPs):</i>	62
<i>Microsatélites (STRs):</i>	64
10. REALIZACIÓN ESTUDIOS ASOCIACION GENÉTICA.....	65
11. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO.....	72
12. BIBLIOGRAFIA.....	75
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	85
CAPÍTULO II: PREDISPOSICIÓN AUTOINMUNE Y GENÉTICA	89
1. INTRODUCCIÓN.....	89
2. MATERIALES Y METODOS.....	91
<i>Pacientes</i>	91
<i>Anamnesis y exploración otoneurológica</i>	92
<i>Criterios de exclusión</i>	94
<i>Cálculo de la agregación familiar</i>	94
<i>Cálculo de la prevalencia de EAs en nuestros pacientes</i>	95
<i>Evaluación inmunoserológica</i>	95
<i>Cuantificación serológica</i>	97
<i>Análisis estadístico</i>	97
3. RESULTADOS.....	98
4. DISCUSION.....	108
5. BIBLIOGRAFIA.....	118
CAPÍTULO III: ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON AUTOINMUNIDAD EN LA ENFERMEDAD DE MENIERE	123

1. INTRODUCCIÓN.....	123
1.1. RESPUESTA INMUNE INNATA (RII).....	129
1.1.1- GENES IMPLICADOS EN LA RII.	129
Gen relacionado a cadenas MHC de Clase I (MICA)	129
1.1.2- GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA:.....	132
Factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF)	132
Interferón gamma (INF γ).....	133
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)	134
Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS)	135
1.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA (RIA)	137
1.2.1- GENES HLA:.....	137
1.2.2- GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS T Y MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA RIA.	140
Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4)	140
Fosfatasa de tirosina tipo 22 (PTPN22)	142
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	144
<i>Pacientes</i>	144
<i>Controles</i>	145
<i>Diseño del estudio</i>	145
<i>Extracción de ADN</i>	145
<i>Controles de calidad</i>	146
<i>Genotipado de STRs y SNPs</i>	146
<i>Análisis estadístico</i>	155
3. RESULTADOS.	156
3.1. GENES IMPLICADOS EN LA RII.	157
3.1.1- Gen MICA.....	157
3.1.2- GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA	163
Factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF)	163
Interferón gamma (INFG)	165
Factor de la necrosis tumoral alfa (TNFA)	168
Oxido Nítrico Sintasa inducible (NOS2A)	169
3.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.	173
3.2.1- GENES DEL HLA.....	173
3.2.2- GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS T Y MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.	182
Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4) y Fosfatasa de tirosina tipo 22 (PTPN22)	182
4. DISCUSIÓN.....	187
5. BIBLIOGRAFIA.	197
CONCLUSIONES.....	198
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	198
ANEXO PUBLICACIONES.....	198

Abreviaturas

A: Adenina.

AAO-HNS: de *American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, en inglés.

AARDA: de *American Autoimmune Related Diseases Association*, en inglés.

AB: Applied Biosystem.

Ac: Anticuerpo.

AG: Aminoglucósidos.

Ag: Antígeno.

AIJ: Artritis idiopática juvenil.

ALSNHL: de *Acute low-tone sensorineural hearing loss*, en inglés.

ANA: Anticuerpos antinucleares.

ADN: Ácido desoxirribonucleicos.

AR: Artritis reumatoide.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNi: ARN de interferencia.

C: Citosina.

CIC: Complejos Inmunocirculantes.

CPA: Célula presentadora de antígenos.

CTL: Células T efectoras.

CU: Colitis ulcerosa.

dB: decibelio.

dbSNP: de *Database of Single Nucleotide Polymorphisms*, en inglés (Base de datos de SNPs).

DT1: Diabetes tipo 1.

EA: Enfermedad autoinmune.

EAOI: Enfermedad autoinmune del oído interno.

EG: Enfermedad de Graves.

EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg.

EII: Enfermedad intestinal inflamatoria.

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, en inglés.

EM: Enfermedad de Meniere.

EMB: Enfermedad de Meniere Bilateral.

EMF: Enfermedad de Meniere Familiar.

EMU: Enfermedad de Meniere Unilateral.

G: Guanina.

GWAS: de *Genome wide association study*, en inglés (Estudios de asociación de genoma completo).

HA: Hipotiroidismo autoinmune.

HE: Hidrops endolinfático.

HLA: de *Human Leukocyte Antigen*, en inglés (Antígeno leucocitario humano).

Hsp70: proteína del shock térmico 70.

HT: Hipotiroidismo.

Hz: Hertzio.

IC: Intervalo de confianza.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleucina.

INF γ : Interferón gamma.

kDa: Kilodalton.

LD: de *Linkage Disequilibrium* en inglés (desequilibrio de ligamiento).

LES: Lupus eritematoso sistémico.

LYP: Tirosina fosfatasa linfoide.

MHC: de *Major histocompatibility complex*, en inglés (Complejo de histocompatibilidad).

MICA: de *Major histocompatibility complex class I chain-related gene A*, en inglés (gen A relacionado a cadenas MHC de Clase I).

MIF: de *Macrophage inhibitor factor*, en inglés (Factor inhibidor de la migración de los macrófagos).

NCBI: de *Nacional Center for Biotechnology Information*, en inglés.

NGE: Neurona del ganglio espiral.

NK: de *Natural Killer*, en inglés.

NOS: de *Nitric oxide sintase*, en inglés (Óxido Nítrico Sintasa).

NS: No significativo.

NO: de *Nitric oxide*, en inglés (Óxido Nítrico).

OR: Odds ratio.

PARP-1: Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa.

Pb: Pares de bases.

PCR: de *Polimerase Chain Reaction*, en inglés (Reacción en cadena de la polimerasa).

PS: Psoriasis.

PTP: Proteína tirosina fosfatasas.

PTPN22: de *Protein tyrosine phosphatase*, en inglés (Fosfatasa de tirosina tipo 22).

RIA: Respuesta Inmune Adaptativa.

RII: Respuesta Inmune Innata.

SNHL: de *Sensorineural hearing loss*, en inglés (hipoacusia neurisensorial).

SNP: de *Single Nucleotide Polymorphism*, en inglés (Polimorfismo de un único nucleótido)

STR: de *Short Tandem Repeat*, en inglés (Repeticiones cortas en tándem).

T: Timina.

TCR: Receptores de los linfocitos T.

TDT: Test de desequilibrio de transmisión.

TNF α : de *Tumor necrosis factor-alpha*, en inglés.

VNTR: de *Variable Number of Tandem Repeats*, en inglés (Repeticiones en tándem de número variable).

χ^2 : Chi cuadrado.

Resumen

La enfermedad de Meniere (EM), caracterizada por crisis de vértigo esporádicas, espontáneas y recurrentes, hipoacusia neurosensorial progresiva, acúfenos y una sensación de plenitud ótica, es un desorden idiopático relacionado con el acúmulo de endolinfa en el oído interno.

La prevalencia estimada varía entre 21 y 190 casos en 100.000 habitantes, habiéndose observado una prevalencia de 75/100.000 para la población española, con un predominio del sexo femenino.

La etiopatogenia de la enfermedad es desconocida y la mayoría de los autores consideran que diversos factores, entre ellos factores autoinmunes y genéticos, están afectando a su desarrollo.

Existen varios esfuerzos para identificar los factores genéticos que están afectando a la enfermedad. La mayoría de esos factores genéticos en la EM han sido propuestos mayormente en estudios de asociación, entre ellos algunos estudios con genes HLA y genes relacionados con el sistema inmunológico. Pero todos estos trabajos han sido realizados con un pequeño número de pacientes y no han conseguido ser replicados en otros estudios independientes. Además, hasta ahora no se ha estimado la razón de riesgo entre hermanos ni la concordancia entre gemelos, lo que demostraría el componente genético de la enfermedad.

El objetivo de esta tesis ha sido estimar la razón de riesgo entre hermanos (λ_s), la prevalencia de enfermedades autoinmunes entre los pacientes e identificar nuevos marcadores genéticos asociados a la EM usando estudios de asociación de genes candidatos para ayudar a esclarecer las bases genéticas de esta enfermedad compleja.

La estrategia utilizada para descubrir los marcadores genéticos ha sido funcional, seleccionando genes que han sido implicados en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad así como genes asociados a otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Hemos usado varias cohortes de pacientes con EM y controles sanos procedentes de varias regiones españolas y a la vez unas cohortes de varios grupos internacionales procedentes de EE.UU., como cohorte de replicación.

El primer objetivo de esta tesis fue demostrar la agregación familiar que existe entre los pacientes con EM y calcular su λ_s . No existe ningún estudio publicado anteriormente que haya analizado el λ_s en la EM y nosotros demostramos una fuerte agregación dentro de las familias de enfermos.

Nosotros también hemos demostrado un incremento de EAs sistémicas (AR, LES y espondilitis anquilosante) en pacientes con EM en nuestra cohorte. La coexistencia de EAs o inflamatorias dentro de la misma familia o incluso en el mismo individuo, propone una coexistencia de mecanismos fisiopatológicos similares en las distintas enfermedades.

El segundo paso de esta tesis fue seleccionar genes implicados en la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa para comprobar su asociación con la enfermedad. Esos genes fueron MICA, MIF, NOS2A, TNFA, HLA, CTLA4 y PTPN22.

Nuestros resultados no mostraron asociación con ninguno de los polimorfismos más famosos estudiados de los genes anteriores. Pero en el caso del gen MICA, el polimorfismo localizado en el exón 5, (GCT)⁴⁻⁹, se vio implicado en la progresión de la enfermedad. Los pacientes que portaban el alelo MICA-A.4 mostraban una progresión más lenta de la enfermedad en comparación con el resto de los pacientes. MICA-A.4 presenta una afinidad mayor al receptor NKG2D, lo que produce una disminución de la expresión de los receptores NKG2D y del propio MICA, que acabaría reduciendo la respuesta de las células NK y CD8⁺. Así, esta variante funcional genera una menor respuesta autoinmune que tendría lugar en los pacientes portadores de este alelo y se traduciría en una progresión más lenta de la enfermedad. Es esencial que estudios posteriores confirmen la presencia de moléculas MICA en el oído interno, así como la respuesta del receptor NKG2D de las células NK en pacientes con EM.

Capítulo I: Antecedentes

Prosper Ménière nació en 1799 en París y fue el primero en cuestionar la hipótesis, aceptada hasta la época, de que el vértigo era una forma de apoplejía cerebral o de epilepsia. Ménière afirmó que se trataba de un desorden del oído interno basándose en la observación de pacientes con vértigo asociado a pérdida de audición y acúfenos. Ménière describió esta condición en Enero de 1861, en la presentación de su trabajo "*Meniere sur des lésions de l'oreille interne donnant lieu à des symptômes de congestion cérébrale apoplectiforme*" a la Academia Imperial de Medicina en París, cuyos miembros no prestaron mucho interés ante una enfermedad que se tenía como incurable [\(1\)](#).

Hoy en día, la enfermedad de Meniere (EM) es descrita como un síndrome (agrupación de síntomas) que incluye vértigo, pérdida de audición, acúfenos y una sensación de plenitud ótica en el oído afecto. También puede ser considerada como un trastorno idiopático relacionado con el acúmulo de endolinfa en el oído interno (hidrops endolinfático, HE) y es el trastorno vestibular asociado a hipoacusia más frecuente.

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

La EM, clínicamente, se caracteriza por crisis de vértigo esporádicas, espontáneas y recurrentes, hipoacusia neurosensorial progresiva, acúfenos y una sensación de plenitud ótica [\(2\)](#). Existen fases de remisión o intercrisis en las que el vértigo puede mejorar gradualmente, así como la

audición, y disminuir el acúfeno, pero a largo plazo la hipoacusia es progresiva ⁽³⁾.

Vértigo:

El vértigo es un síntoma experimentado como una sensación de rotación en la que el individuo tiene la percepción que él mismo o su entorno gira o se mueve, que puede resultar en la pérdida del equilibrio provocando una caída. No se asocia a una disminución del nivel de consciencia. Los episodios de vértigo tienen una duración variable, pero en general suelen durar más de 20 minutos, pudiendo llegar hasta varias horas.

El cuadro vertiginoso agudo, de aparición brusca, se da en el 37-66% de los pacientes ⁽⁴⁾ y el enfermo nota que gira sobre sí mismo o que gira todo lo que le rodea, y suele ser tan intenso que el enfermo debe agarrarse para no caer al suelo. El brote puede estar precedido de un acúfeno de baja frecuencia e ipsilateral. El nistagmo es de características periféricas y si es muy intenso puede producir visión borrosa.

La repetición de los episodios de vértigo sigue una cadencia irregular y las crisis ocurren, posiblemente, por los cambios de presión de la endolinfa, la rotura del laberinto membranoso o los cambios repentinos de la composición de la endolinfa que irritan los epitelios sensoriales del sáculo, el utrículo y los conductos semicirculares. El curso clínico de la enfermedad es progresivo y se caracteriza por la destrucción de los receptores vestibulares y la pérdida de neuronas vestibulares y, por ello,

los episodios vertiginosos van disminuyendo y acaban por desaparecer [\(4\)](#).

Hipoacusia:

La hipoacusia es el segundo síntoma en importancia pero tiene un carácter más estable que el vértigo.

La hipoacusia en la EM es una sordera neurosensorial que puede presentarse en uno o ambos oídos (unilateral o bilateral) y puede ser súbita o brusca, rápidamente progresiva (semanas o meses) o lentamente progresiva (meses o años), siendo ésta la forma de presentación más frecuente. Inicialmente, este síntoma está presente sólo mientras dura el episodio vertiginoso, por lo que el umbral tonal fluctúa en los primeros años. Posteriormente, la hipoacusia aumenta, iniciándose la pérdida de discriminación verbal que va progresando mientras evoluciona la enfermedad.

La pérdida de audición se diagnostica mediante audiometría tonal liminar y lo más frecuente es que afecte solamente a un oído. Sin embargo, la hipoacusia de los pacientes puede presentarse como bilateral en algunos casos. No obstante, también puede pasar de unilateral a bilateral según el tiempo de evolución de la enfermedad [\(5\)](#).

Acúfenos:

Los pacientes describen este síntoma como zumbidos en el oído (ruido blanco) o una sensación de agua fluyendo. Los acúfenos son fluctuantes

en los primeros años de la enfermedad. Generalmente, el acúfeno aumenta su intensidad durante las crisis de vértigo o si el paciente aumenta su hipoacusia. Con el transcurso de la enfermedad se convierte en un síntoma continuo y muy incapacitante que, asociado a la hipoacusia, dificulta mucho la comprensión verbal y puede llegar a convertirse en el síntoma más molesto y principal de la enfermedad a largo plazo.

Plenitud ótica:

Este síntoma es percibido como una sensación de taponamiento, ocupación y presión en el oído. Esta sensación puede ser constante y su intensidad puede aumentar durante las crisis de vértigo.

La EM es una enfermedad crónica y supone un impacto laboral y económico en la calidad de vida relacionada con la salud de los pacientes debido a que la enfermedad se inicia entre la tercera y quinta década de vida afectando mayoritariamente a adultos jóvenes.

Estas limitaciones en la vida personal de los pacientes se ven provocadas sobre todo por los episodios de vértigo que pueden causar ansiedad, obligando a los pacientes a restringir sus actividades sociales y laborales, afectando a su bienestar psíquico. El 30% de los pacientes se ven obligados a cambiar de trabajo o a abandonarlo directamente y el 15% se ve forzado a dejar de conducir [\(6\)](#).

Aunque las crisis de vértigo pueden cursar con intervalos de meses o años, suelen ser muy frecuentes en los primeros años de la enfermedad y, dado que el momento del vértigo es impredecible, se hace difícil su control, convirtiéndolo en el síntoma más incapacitante y fomentando el miedo a no encontrarse en un lugar seguro en el momento de la crisis. En cambio, a medio plazo, el síntoma más incapacitante es la hipoacusia, que acaba provocando dificultades de comunicación y conduce al aislamiento social, genera discapacidad, estrés psicológico y trastorno de ansiedad [\(7\)](#).

La relación entre estrés y EM parece estar consolidada. El estrés produce una estimulación de las glándulas suprarrenales y del eje hipotálamo-hipofisario, lo que se traduce en un aumento de los niveles de cortisol. Estudios anteriores demuestran que los pacientes con EM presentan, en suero o en saliva, elevados niveles de cortisol al ser comparados con individuos control [\(8\)](#).

Tres de cada cuatro pacientes que experimentan un episodio de vértigo han pasado previamente por una situación de estrés y se ha demostrado, mediante análisis con *microarrays*, la expresión de genes relacionados con dicho estrés en los enfermos de Meniere [\(9\)](#). El impacto exacto que tienen los niveles más altos de cortisol en el oído interno y en la homeostasis de la endolinfa todavía continúa sin conocerse.

El estrés crónico puede tener otros efectos en estos pacientes. Así, se ha demostrado una elevada prevalencia de disfunción eréctil ajustada a la edad en varones con EM, que prácticamente duplica la esperada en varones españoles, un 45% frente a un 25% respectivamente. En el caso de las mujeres con EM, la prevalencia de problemas emocionales nos orientaría hacia la presencia de alteraciones en la función sexual y concretamente en el deseo sexual [\(10\)](#).

Además, los pacientes con EM pueden sufrir sueño de mala calidad que a su vez puede causar estrés adicional y llevar a los pacientes a una espiral negativa de síntomas [\(11\)](#).

2. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD.

La historia natural de la EM es caracterizada por varias fases: [\(12\)](#)

- **Fase inicial:** el trastorno del equilibrio puede aparecer de forma solapada o brusca como un episodio de vértigo prolongado y, con frecuencia, el oído enfermo presenta hipoacusia desde mucho antes de la primera crisis vertiginosa, aunque a veces este síntoma no es advertido o es ignorado por el paciente antes de llegar a la consulta. A esto, se suma el acúfeno de tonalidad grave que suele aumentar su intensidad con los episodios de vértigo.

- **Fase intermedia:** después se presenta un periodo de intercrisis. El intervalo es variable y puede aparecer otra crisis de manera seguida. A continuación, los intervalos entre crisis se acortan, los ataques de vértigo

aumentan, pero al cabo de los años los episodios de vértigo acaban por desaparecer a expensas de una hipoacusia severa o profunda del oído afecto.

• **Fase final:** Apenas existen crisis de vértigo pero la hipoacusia neurosensorial, que es retrococlear con pérdida de la discriminación verbal, se hace permanente y progresiva.

3. EPIDEMIOLOGIA.

Incidencia y prevalencia:

Estos parámetros son difíciles de estimar en algunas poblaciones en la EM. Un estudio reciente en los EE.UU. encontró una prevalencia de 190 casos por cada 100.000 habitantes, con una razón mujer:hombre de 1,89:1⁽¹³⁾. Sin embargo, en Japón se ha descrito una prevalencia de 21/100.000; Finlandia 43/100.000; Inglaterra 157/100.000⁽¹⁴⁾ y en Cantabria (España) 75/100.000⁽¹⁵⁾ con predominio en el sexo femenino de unos 29 hombres frente a 46 mujeres. Y en otro estudio realizado para la población caucásica, la EM presentaba una alta prevalencia (1-2 por 1000)⁽¹⁶⁾.

Estas diferencias en los valores de prevalencia de la EM de los diferentes estudios pueden ser debidas a las diferencias geográficas o étnicas, así como a errores metodológicos en las estimaciones.

Edad:

La enfermedad aparece habitualmente entre la cuarta y la sexta década de vida, considerándose excepcional en los niños. La prevalencia de la EM incrementa con la edad pero no de forma lineal, hasta los 60 años [\(13\)](#).

Sexo:

Algunos estudios no aprecian diferencias en el sexo pero, sin embargo, hay otros que establecen un predominio femenino en una proporción de 1-3 veces mayor [\(13\)](#).

4. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Para la correcta clasificación de la enfermedad existe una escala diagnóstica que fue desarrollada por la *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) en 1995 y está basada en criterios clínicos.

En la siguiente tabla (*tabla 1*) observamos la clasificación de la EM según esta clasificación.

EM Posible:
» Episodio de vértigo de tipo Meniere con/sin pérdida de audición documentada.
» Pérdida de audición neurosensorial, fluctuante o fija, con desequilibrio con/sin episodios definitivos.
» Otras causas excluidas (enfermedad tiroidea, hipertensión intracraneal benigna, etc).

EM Probable:
» Un episodio de vértigo espontáneo.
» Pérdida de audición neurosensorial comprobada.
» Acufenos en el mismo oído.
» Otras causas excluidas.

EM Definitiva
<ul style="list-style-type: none"> » Dos o más episodios de vértigo espontáneo con una duración mínima de 20 minutos. » Pérdida de audición neurosensorial documentada. » Acufenos en el mismo oído. » Otras causas excluidas.
EM Cierta:
<ul style="list-style-type: none"> » EM Definitiva más confirmación histológica.

Tabla 1: Criterios diagnósticos para la EM de la AAO-HNS [\(2\)](#).

5. DIAGNÓSTICO.

Para comprender la historia natural de una enfermedad se requieren análisis de un gran número de pacientes durante un periodo prolongado de tiempo. Estos requisitos son difíciles de cumplir en las enfermedades crónicas, que pueden iniciarse hasta en la 6ª década de la vida, y poco comunes como es la EM, y sólo es posible realizando estudios de colaboración multicéntrica. En este sentido, es importante que los diferentes centros usen criterios estandarizados para hacer el diagnóstico de los pacientes y para evaluarlos por largos periodos de tiempo. Para la EM, los criterios aceptados son los que se recogen en las directrices establecidas por la AAO-HNS [\(2\)](#) y que se describen a continuación:

- a. **Vértigo:** Es la sensación o ilusión de movimiento, generalmente rotatorio, cuando no se está en movimiento. Se siente pérdida del equilibrio, desorientación espacial o mareos durante el movimiento. Va acompañado por náuseas y normalmente por vómitos.

b. **Hipoacusia:** Es el síntoma clínico más común, debe ser comprobada con un examen audiométrico (*fig. 1*), y en los primeros estadios de la enfermedad la audición es fluctuante. Ésta puede presentarse de muchas formas:

- El umbral de audición medio a 0.25, 0.5 y 1 kHz es 15 dB o más bajo que el promedio de 1, 2 y 3 kHz.
- En casos unilaterales, el umbral del valor medio a 0.5, 1, 2 y 3 kHz es 15 dB peor en el oído afectado que en el opuesto.
- En casos bilaterales, el umbral del valor medio a 0.5, 1, 2 y 3 kHz es inferior a 25 dB para cada oído estudiado.

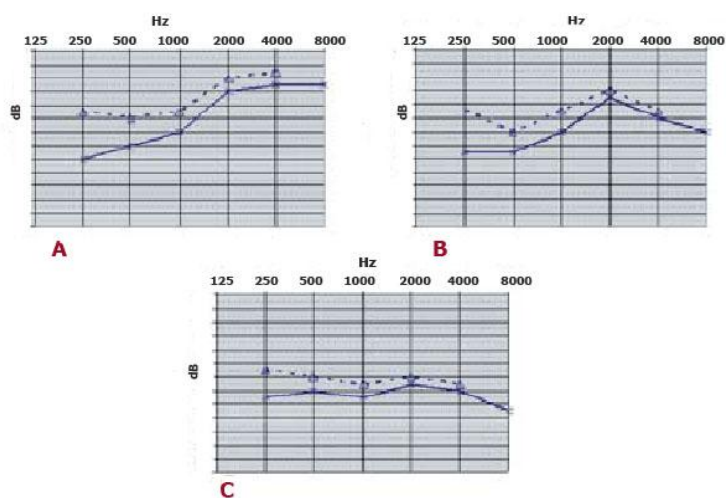


Fig. 1: Audiogramas de pacientes con EM. A) ascendente; B) en pico; C) plano. (Foto adaptada de [\(17\)](#)).

c. **Acúfenos:** Los acúfenos son síntomas bastante difíciles de cuantificar.

Diagnóstico diferencial:

Es necesario diferenciar estos síntomas de los de otras enfermedades que presentan un curso clínico similar. Así, un único episodio de vértigo de varios días seguido de recuperación gradual es más típico de una neuritis vestibular que de la EM. Hay que diferenciar también la EM de la otosífilis que incluye episodios de vértigo tipo Meniere y pérdida de audición. Es importante descartar el síndrome de Cogan que comparte una parte de su sintomatología con la EM, pero se acompaña de afectación ocular.

Aunque el diagnóstico de los pacientes es clínico y se realiza mediante los criterios de la AAO-HNS de 1995, para el diagnóstico diferencial es necesaria una exploración física y algunas pruebas complementarias como la audiometría tonal liminar, la audiometría verbal, los potenciales evocados auditivos, pruebas vestibulares y pruebas de imagen, entre otras, para descartar otras causas de disfunción cocleo-vestibular.

6. TRATAMIENTO.

El tratamiento de la EM es diferente según el momento en el que se encuentre el paciente. Podemos hablar, por tanto, de tratamiento de la crisis y de tratamiento de mantenimiento en momentos intercríticos, cuyo objetivo fundamental es la reducción del HE para que la crisis no se repita. Todos los tratamientos que se describen a continuación están

destinados a paliar los síntomas y ninguno de ellos consigue curar la enfermedad.

» **Fármacos:**

En el período de la crisis, el tratamiento busca disminuir la intensidad de los síntomas y sobre todo del vértigo, que resulta ser el más limitante. Para ello se emplea el uso de fármacos que durante la fase aguda tienen como objetivo disminuir la sensación de movimiento que experimenta el paciente y todo el cortejo vegetativo que le afecta.

Los medicamentos antivertiginosos se conocen como sedantes del aparato vestibular pues reducen la excitabilidad de las neuronas del núcleo vestibular. Se utilizan sustancias de diferentes tipos como los neurolépticos, las benzodiazepinas, los antihistamínicos, los anticolinérgicos y los antagonistas dopaminérgicos y todos tienen diversas reacciones adversas y efectos secundarios, a tener en cuenta. A menudo los pacientes con EM son tratados con benzodiazepinas para tratar su vértigo. Sin embargo, esta medicación puede disminuir la calidad del sueño, lo cual puede agravar la enfermedad. Se recomienda realizar estudios de sueño antes de comenzar el tratamiento con estos fármacos [\(11\)](#).

Los diuréticos regulan la homeostasis del oído interno, evitando la sobrecarga hídrica. En este caso se deberán realizar controles hidroelectrolíticos con frecuencia a los pacientes mientras se mantiene el

tratamiento y completar con un aporte de K^+ . Por otro lado, es necesario un tratamiento de soporte que evite la deshidratación y desnutrición secundarias al cuadro. Ninguno de los estudios sobre el uso de diuréticos en la EM ha demostrado su utilidad en la prevención de la pérdida auditiva, los acúfenos o la sensación de plenitud ótica [\(18\)](#).

De igual modo, para lograr la recuperación de la función vestibular periférica se pueden usar corticoides. Los corticoides son un tratamiento controvertido tanto por la dosis utilizada como por el fármaco. Pero se ha demostrado un control del vértigo a corto plazo en casi la mitad de los pacientes tratados (47%), y también se aprecia una mejoría subjetiva del acúfeno (48%), de la hipoacusia (35%) y de la plenitud ótica (48%) de los sujetos tratados en comparación con controles [\(19\)](#).

El control interno del vértigo es del 75-82% [\(20\)](#). El efecto en la audición es prácticamente marginal y a largo plazo se produce un deterioro auditivo en el 16% de los pacientes [\(21\)](#).

Los corticoides, en el oído interno, interactúan tanto con receptores de glucocorticoides como con actividad mineralocorticoide. Se ha demostrado que el efecto de los esteroides se ejerce más bien sobre el transporte de Na^+ en la endolinfa y no por su efecto inmunosupresor o antiinflamatorio [\(22\)](#).

Por tanto, la utilización de gentamicina o corticoides por vía intratimpánica está indicado para pacientes que, a pesar de mantener un

cuidado preciso en la ingesta de sal y seguir un tratamiento médico adecuado, presentan crisis de vértigo que repercuten negativamente en sus actividades cotidianas personales, laborales o familiares.

La mejoría en la calidad de vida y reducción del nivel de discapacidad se deriva de la reducción del número de crisis y la duración de éstas. Aun así, esta droga causa daños directos en el epitelio neurosensorial y en las células oscuras del laberinto, que afectan a la función vestibular y coclear.

Se ha descrito un subgrupo de pacientes altamente susceptibles a la ototoxicidad asociada a aminoglucósidos (AG) debido a una mutación del ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (1555A>G). Estos pacientes pueden quedar sordos por una sola aplicación de AG y se recomienda, entonces, el uso de otros antibióticos hasta haber realizado pruebas genéticas [\(23\)](#).

» **Rehabilitación vestibular:**

Esta terapia consiste en movimientos de los ojos, cabeza y cuerpo que facilitan la compensación central de la pérdida de los reflejos vestibulo-oculares y vestibulo-espinales. Está indicada una vez pasada la fase aguda, en pacientes que ya pueden incorporarse y deambular y que reciben terapia médica o para los que han sufrido otros procedimientos más agudos [\(24\)](#).

» Medidas higiénico-dietéticas:

Entre las medidas higiénico-dietéticas destacan la restricción de sal, alcohol y nicotina. Además, se recomienda evitar aquellos hábitos que supongan un nivel de fatiga o estrés elevado para el paciente. Disminuir el estrés diario y adoptar estrategias para combatirlo es una buena medida para los enfermos con EM. Incluso, en algunos casos, debe ser acompañada de una intervención psicológica.

En el momento de la crisis el paciente deberá abandonar cualquier actividad que se esté llevando a cabo, adoptar la posición de reposo en decúbito en un lugar calmado y prevenir los cambios rápidos de postura. Cuando las crisis no son muy intensas, en algunas ocasiones, no será necesario recurrir al tratamiento farmacológico.

» Tratamiento quirúrgico:

Existen diferentes técnicas quirúrgicas que se emplean cuando los tratamientos anteriores no han sido efectivos:

1. La cirugía endolinfática consiste en el drenaje del saco endolinfático para lograr el balance hídrico del oído interno y cuya eficacia es muy discutida.
2. La laberintectomía transmastoidea o transcanal, dos técnicas con el mismo resultado que provocan la destrucción del oído interno al extirpar el laberinto membranoso con la consiguiente disminución del vértigo, pero sacrificando la audición, factor a

tener en cuenta si consideramos que probablemente el otro oído también se puede afectar con el tiempo. Esta es una buena técnica para pacientes de edad avanzada con hipoacusia grave-profunda y crisis intensas.

3. La neurectomía vestibular, que consiste en la sección de los nervios vestibulares en el conducto auditivo interno, con la preservación de la audición. A pesar de mantener la audición es un procedimiento que provoca la ablación de la función vestibular completa que precisa pues de una capacidad de compensación inmejorable para recuperar la estabilidad. Hay que tener en cuenta que las personas de avanzada edad no se recuperan bien de este tipo de operaciones al tener una capacidad de adaptación vestibular menor.

» **Tratamientos para mejorar la hipoacusia:**

Los avances técnicos han mejorado espectacularmente el tratamiento de la pérdida auditiva, siendo los audífonos y los implantes cocleares dos herramientas imprescindibles para el tratamiento de algunos tipos de sordera.

Los audífonos transmiten la energía acústica que llega a la entrada del pabellón auditivo, transformando la energía acústica en eléctrica que podemos manipular y amplificar para volver a transformarla después en energía acústica, hasta el tímpano. En pacientes con hipoacusia bilateral

profunda, que se benefician de forma insuficiente o nula de los audífonos, se utilizan los implantes cocleares.

Los implantes cocleares estarían indicados en individuos con umbrales auditivos bilaterales superiores a 80-90dB de media en las frecuencias de 500Hz, 1Hz y 2Hz.

» **Tratamientos con terapia génica:**

La terapia génica consiste en la inserción de copias funcionales de genes que se encuentran ausentes en un individuo con el objetivo de tratar una enfermedad.

El avance más prometedor en la aplicación de la terapia génica a la restauración de la función auditiva ha sido, entre otros, el descubrimiento del gen ATOH1 (MATH 1) que induce la diferenciación de las células ciliadas [\(25\)](#). La transfección de vectores adenovirales que expresan el gen MATH1 produce la formación de células tipo células ciliadas en el órgano de Corti de cobayas a las 5 semanas de su inoculación y a los 2 meses las cobayas recuperan la morfología normal de su epitelio auditivo.

Un amplio número de trabajos *in vivo* e *in vitro* han descubierto diversos factores de crecimiento que promueven la supervivencia de las neuronas del ganglio espiral (NGE), entre los que se encuentra el factor neurotrófico BDNF y cuya construcción y posterior transfección de adenovirus que contienen dicho gen a cobayas a las que se les ha

inducido una sordera promueve la secreción de BDNF por parte de las células e incrementa la supervivencia de las NGE [\(26,27\)](#).

Recientes avances en terapias para la pérdida de audición auguran unos resultados esperanzadores, más específicos y menos traumáticos, que restauran el sistema auditivo. La introducción de la tecnología de ARNi (ARN de interferencia) consigue reducir los efectos no específicos prometiendo una potente y segura estrategia.

Por otro lado, una consecuencia de la alta producción de especies reactivas del oxígeno en los pacientes con EM es la pérdida de audición. Por ello, los antioxidantes pueden proteger a las células dañadas y evitar la ototoxicidad preservando la función auditiva. En este sentido, la terapia génica ofrece una alternativa al plantear la posibilidad de sobre-expresar las enzimas antioxidantes en el oído interno. Estas enzimas podrían ser introducidas en la cóclea mediante transgenes y ejercer su efecto neuroprotector en el oído interno [\(28\)](#).

Otra terapia esperanzadora es el tratamiento con células madre, que en el oído interno permitirán reparar y regenerar las células cocleares; pero, hasta el momento, estas estrategias terapéuticas son experimentales y no se pueden aplicar aún a los pacientes [\(29\)](#).

7. ETIOLOGIA Y PATOGENIA.

Antes del desarrollo del apartado de etiopatogenia de la Enfermedad de Meniere es importante tratar la anatomía funcional del oído interno.

Anatomía funcional del oído interno.

Al oído interno se le llama también laberinto debido a su complejidad anatómica (*fig. 2*).

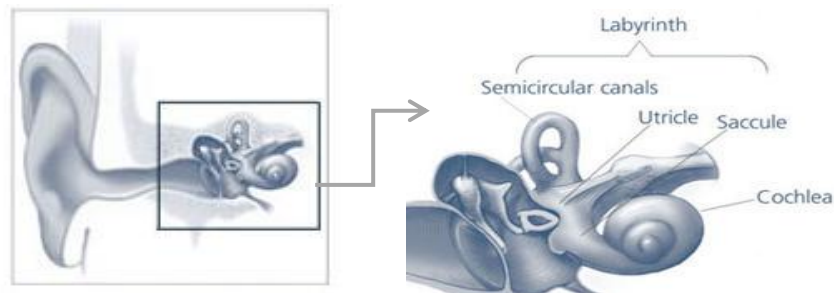


Fig. 2: Esquema del oído interno. La figura de la derecha muestra el laberinto anterior o cóclea y el laberinto posterior o laberinto con las tres partes que lo componen (sáculo, utrículo y canales semicirculares).

Éste está formado por un laberinto anterior, también llamado *cóclea* o caracol, y un laberinto posterior, o *laberinto* propiamente dicho:

Laberinto anterior (cóclea): es el encargado de la función auditiva. Constituido a su vez por el laberinto óseo anterior y por el laberinto membranoso anterior.

Laberinto óseo anterior, del que forman parte la cóclea o caracol y el acueducto del caracol. La cóclea se abre a una cavidad central o vestíbulo, que a su vez recibe tres conductos, los conductos semicirculares.

Laberinto membranoso anterior, constituido dentro del óseo, está formado por 3 rampas o túneles membranosos: la rampa timpánica, la rampa coclear y la rampa vestibular. La rampa timpánica y vestibular

contienen perilinfa, un fluido de composición iónica similar al líquido cefalorraquídeo, mientras que la rama coclear contiene endolinfa (fig. 3).

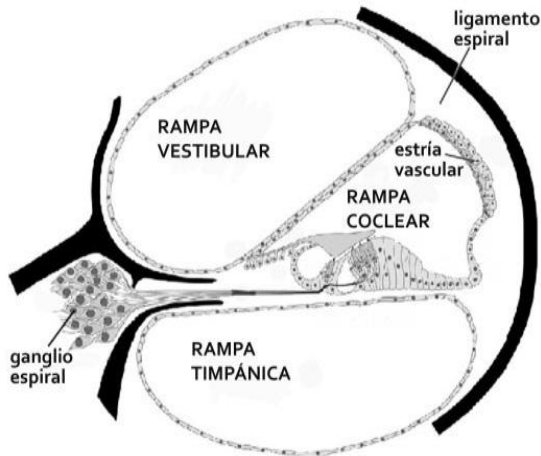


Fig. 3: Sección transversal de la cóclea. La rama vestibular y la timpánica contienen perilinfa y la rama coclear contiene endolinfa. Estas tres cámaras están separadas por dos membranas: la membrana de Reissner, entre la rama vestibular y la rama media o coclear; y la membrana basilar, entre la rama media o coclear y la rama timpánica (Figura modificada de *Current Mol. Med.* 2009. 9(5):546-64).

La rama coclear es la que soporta el órgano de Corti, estructura en la que se ubican los receptores sensoriales de la audición y al que, por tanto, llegan las terminaciones del nervio auditivo; la membrana de Reissner, la estria vascular y el rodete del ligamento espiral. Todas estas estructuras se sitúan en la rama coclear en contacto con la endolinfa (fig. 4).

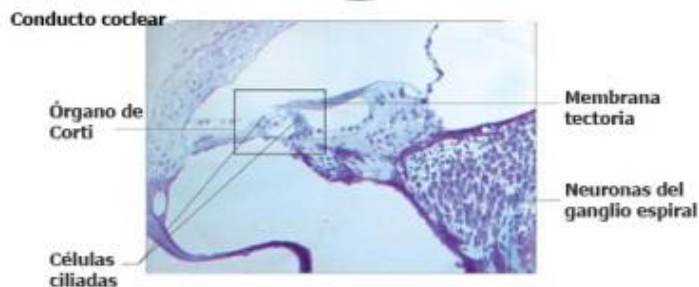


Fig. 4. Sección transversal del conducto coclear. Podemos ver el epitelio sensorial (órgano de Corti) y las NGE. Las células ciliadas son cubiertas por una membrana gelatinosa llamada membrana tectoria. (Foto modificada de [\(30\)](#)).

La endolinfa está constituida por un fluido que presenta una elevada concentración de K^+ y una baja concentración de Na^+ . El gradiente de K^+ es mantenido en la cóclea por las células marginales de la estría vascular que son las responsables de la incorporación de K^+ en la endolinfa.

La endolinfa difiere en su composición entre las diferentes partes del oído interno y también del fluido que la rodea, la perilinfa. La absorción de este K^+ y Na^+ es mediada por las células sensoriales, membrana de Reissner y células epiteliales de la cóclea, entre otras (fig. 5).

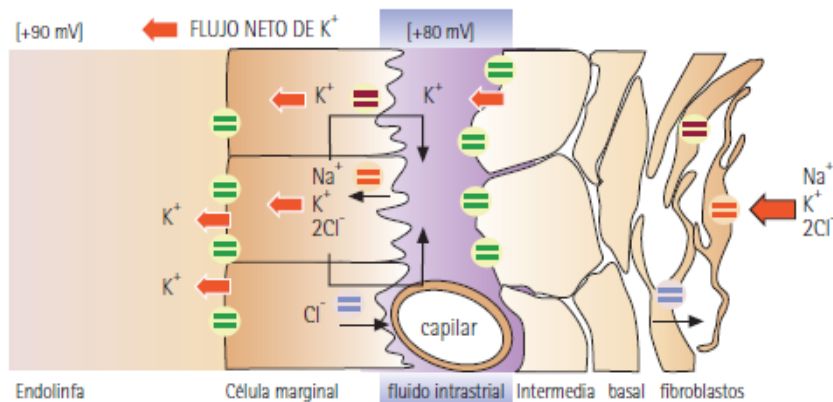


Fig. 5: Transporte iónico en la estría vascular. El flujo del K^+ sigue un trayecto unidireccional hacia la endolinfa y luego es reciclado en la perilinfa.

El reciclaje de K^+ desde la perilinfa implica su re-captación a través de los fibrocitos del ligamento espiral (31). La composición de la endolinfa y la perilinfa difieren entre sí, la perilinfa es similar a los líquidos

extracelulares y al líquido cefalorraquídeo y la endolinfa se caracteriza por una abundancia de K^+ , lo que provoca un potencial endolinfático denominado potencial endococlear, desempeñando un papel principal en la transmisión del estímulo como en la excitación de la célula sensorial.

Laberinto posterior: formado por el laberinto óseo posterior y el laberinto membranoso posterior:

Laberinto óseo posterior formado por el vestíbulo óseo; tres conductos semicirculares abiertos por sus dos extremos al vestíbulo óseo; y por el acueducto del vestíbulo.

Laberinto membranoso posterior está constituido por dos bolsas denominadas utrículo y sáculo, que se denominan órganos otolíticos y que contienen un epitelio diferenciado en una región de los mismos, denominadas máculas que son los receptores sensoriales de la aceleración cefálica. Dentro del laberinto membranoso están unidas entre sí y se prolongan en el conducto y el saco endolinfático (*fig. 6*).



Fig. 6: Localización del saco endolinfático en el oído interno. El saco endolinfático parece estar relacionado con la respuesta inmunológica de los individuos. (Figura de: *NIH Medical Arts.*)

La *etiología de la EM* es realmente desconocida. La mayoría de los autores consideran que la EM es multifactorial [\(32\)](#), pero el hallazgo de HE en huesos temporales de pacientes es clave para entender la enfermedad.

Hidrops endolinfático:

Basada en estudios de autopsias de oídos de pacientes con EM, la base patológica de la EM desde 1938 es el HE, o lo que es lo mismo, la dilatación del laberinto membranoso por un aumento de volumen de la endolinfa con respecto a la perilinfa, lo que se traduce en estrés celular y disfunción cocleo-vestibular.

Es posible que en la cóclea la alteración comience en los fibrocitos del ligamento espiral.

La endolinfa es producida en el conducto coclear a nivel de la estría vascular y se reabsorbe en el saco endolinfático. La interrupción de este flujo provoca la acumulación de la endolinfa desarrollando el HE. Los factores desencadenantes del HE descritos son : el aumento de producción de endolinfa, la disminución de la absorción de la endolinfa por el saco endolinfático, el desequilibrio iónico, las alteraciones genéticas, infecciones virales, factores dietéticos, reacciones autoinmunes, irregularidades vasculares o respuestas alérgicas. La presión de la endolinfa dentro del conducto coclear produce una dilatación con elongación de la membrana de Reissner.

Las estructuras dilatadas (*fig. 7*) –en los periodos de máxima tensión- se rompen en determinadas zonas débiles del laberinto membranoso, escapándose la endolinfa hacia el espacio perilinfático; se mezclan así la endo y la perilinfa con el conflicto iónico que esto supone.

Se ha demostrado que una solución de yoduro de potasio causa episodios típicos de Meniere (34). Así, la intoxicación por K^+ resulta en una completa y crónica pérdida de motilidad de células ciliadas externas y finalmente la muerte celular, lo que sugiere ser la base patofisiológica en algunos pacientes con EM. Todos estos hallazgos han sido observados en cobayas con hidrops inducido previamente (35) (*fig. 8*).

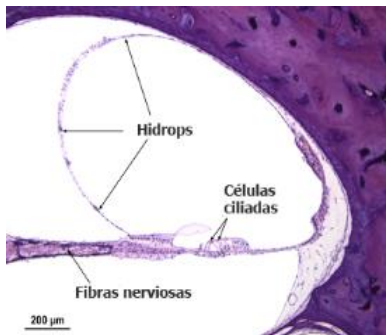


Fig. 7. Imagen de la espira media superior de la cóclea de un paciente con EM. Se puede observar un hidrops difuso y las células ciliadas y fibras nerviosas del ganglio espiral. (Imagen adaptada de (33)).



Fig. 8: HE inducido en cobayas. A la izda., una sección del conducto coclear normal; a la dcha., un oído con HE. Las flechas indican la dilatación de la membrana de Reissner debido al hidrops (35).

La inducción experimental del hidrops ha sido desarrollada como un intento de generar un modelo animal de enfermedad. Pero las cobayas a las que se les ha provocado un hidrops no presentan signos de trastorno vestibular recurrente, y aunque tienen alteraciones en el umbral auditivo, la hipoacusia fluctuante de baja frecuencia no ha sido bien documentada [\(36\)](#).

A pesar de estas investigaciones, la idea generalizada de que la EM está asociada a un HE está siendo revisada [\(37\)](#). La EM ocurre en un 0,2/100 personas aproximadamente, y el HE se detecta en 6 de cada 100, por lo que no es posible explicar los síntomas de la EM basándose solamente en el HE. Además, la severidad del hidrops no explica la magnitud de la pérdida de audición.

En experimentos realizados con cobayas a las que se les indujo un HE mediante bloqueo del conducto endolinfático, demostraron que las alteraciones de los fibrocitos del ligamento espiral en la cóclea ocurrían antes de la aparición del hidrops.

Mediante inmunohistoquímica se pudo observar que los fibrocitos tipo I mostraron un aumento de la expresión para el cotransportador NaK₂Cl (KKCC1), además de una disminución de la tinción para taurina, un aminoácido utilizado por las células como osmolito. Esta disminución de la tinción de taurina refleja la apoptosis de los fibrocitos tipo I y tipo II antes de que se produzca el hidrops.

Los resultados del anterior experimento se muestran en la siguiente figura (fig. 9).

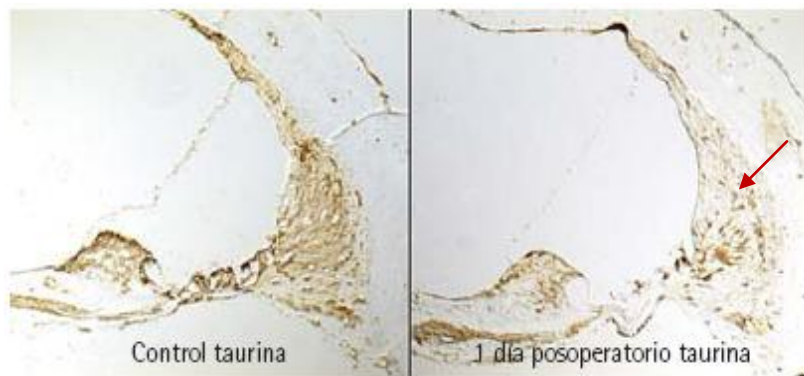


Fig. 9 Cortes cocleares inmunoteñidos con taurina. A la izda., un oído control. A la dcha., un oído tras inducirle un hidrops experimental, sin muestras del hidrops todavía pero con disminución y apoptosis de los fibrocitos del ligamento espiral (flecha roja). (Imagen adaptada de [38](#)).

Los hallazgos anteriores apoyan la idea de que el HE es un marcador de una alteración de la homeostasis del laberinto, donde uno o varios factores desconocidos producen los síntomas de la EM y el HE. La fig. 10 muestra de manera esquemática esta conclusión.

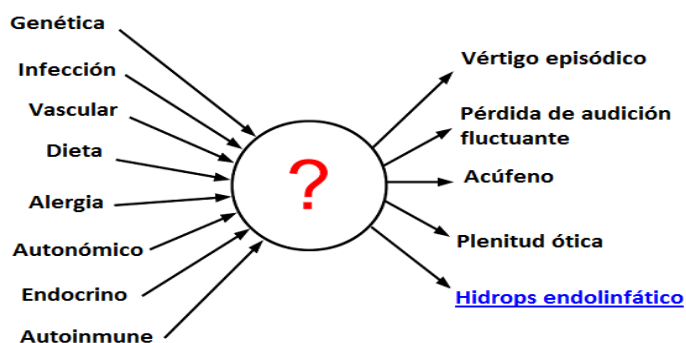


Fig. 10: Esquema que muestra al HE como un síntoma más de la enfermedad. (Fig. adaptada de [63](#)).

Alteraciones celulares y moleculares:

Desde el punto de vista macroscópico, en el oído afectado, la mastoide presenta un menor tamaño, el seno lateral es muy anterior, el acueducto vestibular es más corto, con apertura externa y periacueductal más estrechas. Además se han encontrado diferencias significativas en el grosor de la membrana oval de los pacientes con EM al ser comparada con el grosor en personas sanas [\(39\)](#).

Desde el punto de vista microscópico, además de las alteraciones del HE, también se observan alteraciones significativas en pacientes con edad avanzada como son la pérdida de células ciliadas, atrofia de las células de soporte en el órgano de Corti y distorsión y atrofia de la membrana tectoria.

Las NGEs se dividen en dos tipos: neuronas tipo I (representan el 90%) y neuronas tipo II (representan el 5-10% del total del ganglio). En los enfermos con EM se observa una degeneración de estas neuronas antes de aparecer daños en las células ciliadas de la cóclea. Se ha observado una disminución significativa del número de terminaciones nerviosas aferentes (neuronas tipo I) y sinapsis en la base de las células ciliadas externas e internas en el lado afecto en un caso de EM unilateral [\(40\)](#).

La pérdida de células ciliadas internas es significativamente más baja que la pérdida correspondiente de NGE [\(41\)](#). Estos datos apoyarían la hipótesis de que la pérdida de NGE podría ser el evento inicial de la

cascada de eventos degenerativos que ocurren en la cóclea y que culminan en la pérdida de células ciliadas.

Mediante estudios de regresión se han conseguido correlacionar la pérdida de células ciliadas con la pérdida neuronal, siendo las primeras dependientes de las segundas. Sin embargo, cuando se intentó correlacionar la pérdida de células ciliadas internas con el HE no se encontraron diferencias significativas [\(41\)](#).

La ausencia de relación entre la severidad del HE y la pérdida de células ciliadas indica que el hidrops es, en realidad, un epifenómeno y no está directamente envuelto en la destrucción de las estructuras cocleares.

Virus:

Se han encontrado anticuerpos (Ac) para el virus del herpes en pacientes de EM [\(42\)](#), pero estos Ac también se han encontrado en el saco endolinfático y en el epitelio de personas sanas.

Por lo tanto, estos datos son interesantes pero resultan muy inespecíficos, y necesitan ser más investigados.

Autoinmunidad:

Existen algunos estudios que indican que el sistema inmunitario podría estar implicado en el desarrollo y la progresión de la EM [\(43\)](#). La autoinmunidad se define como un estado en el cual la tolerancia del sistema inmunológico hacia lo propio se ha perdido. Si esta pérdida de

tolerancia se prolonga en el tiempo y ocurre con suficiente magnitud se produce daño tisular.

La patogénesis de la autoinmunidad está mediada por factores genéticos, inmunológicos y virales interactuando de manera compleja mediante mecanismos que aún no son entendidos en profundidad. Los mecanismos que provocan la autoinmunidad son los mismos que están asociados a la respuesta inmunológica convencional frente a la invasión de patógenos, y éstos incluyen Ac solubles, células T CD4⁺, células T CD8⁺, macrófagos y otras células fagocíticas, así como los mastocitos. Los Acs pueden inducir daño debido a su unión directamente a antígenos (Ag) celulares y también provocando la activación del sistema del complemento y el depósito de IC [\(44\)](#).

Existen evidencias que indican que el desarrollo de la mayoría de las enfermedades autoinmunes (EAs) esta condicionado por una predisposición genética que es compleja, debido a que múltiples genes determinan su presentación [\(45\)](#). A menudo, las bases genéticas de una EA incluyen la presencia de alelos o haplotipos particulares del complejo HLA (antígeno leucocitario humano), siendo el alelo más investigado el HLA-DR4 en la artritis reumatoide (AR), y HLA-DQ2 y DQ8 en la enfermedad celíaca (EC) [\(46\)](#).

En 1986, se realizó un tipaje de HLA en 41 pacientes con EM de los cuáles el 75% de ellos presentó asociación significativa con el alelo HLA-Cw*7 [\(47\)](#).

En el caso concreto de la pérdida de audición neurosensorial (SNHL) se describieron 18 casos que respondieron positivamente a la terapia con inmunosupresores. Nueve de esos pacientes padecieron simultáneamente otras EAs como el síndrome de Cogan, colitis ulcerosa (CU), y AR. Ninguno de los pacientes tuvo lupus eritematoso sistémico (LES), aunque nueve de los pacientes presentaban respuesta positiva para anticuerpos antinucleares (ANA) [\(48\)](#).

Un trabajo publicado en 2002 ha demostrado un aumento de interferón gamma (INF γ) específico del oído interno que es segregado por las células Th1 en la sangre periférica de pacientes con hipoacusia neurosensorial con sospecha de origen autoinmune [\(49\)](#).

También se demostró en el año 1990 que un porcentaje significativo de pacientes con SNHL presentaban un Ac para una proteína de 68 kD en suero, cuando éstos fueron analizados por Western blot frente a Ags del oído interno [\(50\)](#). Estos Acs se detectaron también en pacientes con EM [\(51,52\)](#). Esta proteína era la proteína de shock térmico 70 (hsp70). Pero en 2009, otro grupo de investigación no encontró asociación entre anti-HSP-70 [\(53\)](#), factor de la necrosis tumoral alfa (TNF α), la velocidad de

sedimentación globular y ANA en el suero de los pacientes con EM, por lo que no puede considerarse como información clínica útil.

Los enfermos de EM, también han presentado Acs frente a una proteína de 30kDa del nervio acústico y del ganglio espiral.

Además, otra proteína que se encuentra en la fracción membranosa (conteniendo la membrana basal, el órgano de Corti, la estría vascular, el ligamento espiral y el epitelio vestibular), esta vez de 28kDa denominada raf-1, se ha visto que reacciona fuertemente con el suero de pacientes con EM (46% de los pacientes dieron positivo para este antígeno) [\(54\)](#).

También los niveles de C3c y C1q estaban elevados al ser comparados con los niveles en individuos control [\(55\)](#). Complejos de un tipo de inmunoglobulina (Ig), la IgM y componente C1q también se han relacionado con la EM. Los fragmentos C3a y C5a, causan fuertes daños en el oído interno pero de corta duración, por lo que el daño es reversible [\(56\)](#). Pero el daño causado por C4a, continuamente activado, debe ser irreversible y provoca la atrofia de la estría vascular, la apoptosis de las neuronas cocleares y adelgazamiento de la membrana de Reissner.

Se ha demostrado que alrededor del 60% de los pacientes de EM presentan Acs en suero frente a proteínas del oído interno y existen evidencias de presencia de citoquinas en la cóclea incluyendo la IL-1 α , TNF- α , NF- κ β , P65, P50 y I κ β [\(57\)](#).

El cociente de las células T CD4+/CD8+ aparece elevado en trabajos realizados con pacientes con hipoacusia neurosensorial. Y este hallazgo también ha sido demostrado en la EM por otros investigadores que comprobaron esta relación, en un 38% de sus pacientes estudiados [\(58\)](#), pero trabajos más recientes no han sido capaces de confirmar estos hallazgos [\(59\)](#).

Por otro lado, al estudiarse la histopatología del hueso temporal en pacientes con LES se han encontrado pérdida de células ciliadas, atrofia del órgano de Corti y degeneración del ligamiento espiral, entre otras [\(60\)](#). También ha sido demostrada una asociación entre la EM y la enfermedad tiroidea autoinmune [\(59\)](#), lo cual es otra evidencia que sugiere que el factor autoinmune está envuelto en la patogénesis de esta enfermedad.

Predisposición hereditaria:

En la EM aparecen formas familiares y formas esporádicas de la enfermedad. Aunque el proceso es complejo, probablemente causas genéticas y causas ambientales estén presentes en ella. Así, uno de cada tres pacientes con EM tienen un pariente cercano (primer grado) relacionado con la enfermedad [\(61\)](#).

Aunque las causas genéticas aún sean desconocidas, la EM tiene una incidencia mayor en algunas familias como se ha demostrado en diferentes estudios que analizaron pedigríes familiares, en los que se

llegó a la conclusión, entre otras, de que entre el 2,5-14% de los pacientes con EM tienen una predisposición genética [\(62-65\)](#). Actualmente se estima que la EM familiar (EMF), podría explicar hasta un 14% de los casos [\(61\)](#).

Tras estos indicios, diversos genes han sido estudiados en la EM intentando encontrar la relación entre éstos y la enfermedad.

El gen COCH, localizado en el cromosoma 14, ha sido estudiado por varios grupos. Dicho gen contiene dos tipos diferentes de dominios y la función biológica es incierta pero se sabe que se expresa predominantemente en el oído interno a nivel del ligamento espiral, el limbo espiral, la lámina espiral ósea, y el estroma de los órganos vestibulares y constituye el 70% de todas las proteínas del oído interno [\(66\)](#).

Este gen fue descubierto en varias familias con hipoacusia y trastorno del equilibrio y actualmente se considera como marcador para una forma de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica dominante (DFNA9), donde más del 25% de las personas afectadas sufrían además de pérdida de audición, síntomas observados en los pacientes de Meniere [\(67\)](#).

Sin embargo, otros investigadores, tras secuenciar los 12 exones del gen COCH en 20 pacientes con EM no pudieron encontrar ninguna mutación en los pacientes, sugiriendo que el gen COCH no es una de las principales causas para la enfermedad [\(68\)](#). Esto fue apoyado por los resultados de otros investigadores en 2004 [\(69\)](#) al secuenciar los exones 4 y

5 de dicho gen y no hallar diferencias significativas al comparar pacientes con grupos control.

Por lo tanto, hasta ahora, ninguna de las mutaciones descritas en el gen COCH se han demostrado en los pacientes con EM [\(70\)](#).

Otros genes han sido estudiados intentando encontrar relación entre éstos y la EM. Entre ellos encontramos el gen de la antiqúina [\(71\)](#), diversos genes de los canales de K⁺, la alfa-adducina y HSP-70 [\(72-73\)](#). También se han relacionado con la EM algunos polimorfismos del gen de la PARP-1 (Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa) [\(74\)](#).

Evidencias que confirman esta predisposición genética de la enfermedad es la asociación directa entre la EM y ciertos alelos HLA, concretamente, HLA-B*27 [\(75\)](#), HLA-B*44, HLA-B*13 [\(76\)](#), HLA-Cw*7 [\(47\)](#), HLA-DRB1*1602 [\(77\)](#) y HLA-DRB1*1101 [\(78\)](#) entre otros, en diversas poblaciones. La asociación de alelos con el complejo HLA fortalece la hipótesis de la predisposición autoinmune, vista anteriormente, en la EM.

En la *tabla 2* se representan los genes que hasta ahora se han asociado con la EM.

Todos estos estudios de asociación con genes candidatos están realizados con un tamaño de muestra pequeño, por lo que sus resultados no tienen suficiente potencia estadística, y pueden dar lugar a falsos positivos. A esto se le suma el hecho de que ninguno de

los resultados obtenidos con estos genes candidatos ha conseguido ser replicados en otras poblaciones independientes.

Autores	Población	N	Locus	OR
Fransen <i>et al.</i> , 1999	Holandesa	3	DFNA9 / COCH	NA
Teggi <i>et al.</i> , 2008	Italiana	28	A-adducina	NA
Kawaguchi S. <i>et al.</i> , 2008	Japonesa	49	HSP70	NA
López Escámez <i>et al.</i> , 2009	Española	80	PARP-1	7,33
Rawal <i>et al.</i> , 2010	Americana	2	HLA-B*27	NA
Yeo SW <i>et al.</i> , 2002	Koreana	39	HLA-B*44	0,1
Yeo SW <i>et al.</i> , 2002	Koreana	39	HLA-B*13	7,4
Xenellia <i>et al.</i> 1986	Inglesa	41	HLA-Cw7	NA
Koyama <i>et al.</i> 1993	Japonesa	20	HLA-DRB1*1602	NA
Meng <i>et al.</i> , 2001	China	60	HLA-DRB1*09	0,17
Koo <i>et al.</i> , 2003	Koreana	41	HLA-DRB1*0405	NA
López Escámez <i>et al.</i> , 2007	Española	88	HLA-DRB1*1101	3,65

Tabla 2: Esquema de genes asociados con la EM. Los distintos genes relacionados con la EM han sido estudiados por diferentes autores y en diversas poblaciones. Ninguno de los trabajos anteriores ha sido replicado en otras poblaciones independientes. (OR: Odds Ratio; NA: No asociado).

Por tanto, estas asociaciones no pueden ser consideradas como relevantes hasta que no se repliquen en otros estudios.

8. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA.

Los estudios de asociación genética buscan establecer una relación entre las variantes genéticas que existen en una población y un fenotipo determinado de una enfermedad en concreto.

Esa relación es una correlación meramente estadística ya que la asociación no es un fenómeno genético sino sólo una afirmación estadística respecto a la concurrencia de los alelos o los fenotipos. Es decir, el alelo A se asocia a la enfermedad D si la persona que tiene D también tiene el alelo A con una frecuencia mucho mayor (o menor) de lo que podría predecirse a partir de las frecuencias individuales de A y D en la población normal.

Estos estudios de asociación genética son la estrategia más utilizada a la hora de buscar correlaciones genéticas con enfermedades. Son capaces de detectar asociaciones débiles, pero en los casos-controles se corre el riesgo de detectar falsos positivos. El seguimiento de un falso positivo debe ser evitado si se consiguen replicar los resultados de un estudio concreto (79).

El método ideal para buscar una asociación genética con una enfermedad es realizar la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) en la que elegimos padres heterocigotos para estudiarlos frente a sus hijos afectados, pero en enfermedades de inicio tardío, como es el caso de la EM en la que es difícil disponer de los padres, resulta más práctico el estudio de casos-controles.

Gracias al Proyecto del Genoma Humano (<http://www.genome.gov>), iniciado en el año 1990 ha sido posible identificar todos los genes

presentes en el ADN, siendo la información de la secuencia del genoma humano conocida y de acceso libre.

El orden de A (adeninas), T (timinas), C (citosinas) y G (guaninas) es extremadamente importante. Este orden determina, incluso, la especie a la que pertenece un organismo. Pero las diferencias en este orden, si se producen entre los humanos, ocasionan las diferencias en el riesgo a padecer las enfermedades o las diferentes respuestas al tratamiento. Por ello, uno de los objetivos de este proyecto ha sido averiguar estas diferencias o variaciones en el genoma para poder entender el comportamiento de las enfermedades complejas, entre otras.

9. VARIANTES POLIMORFICAS.

Una importante aportación del Proyecto del Genoma Humano ha sido el descubrimiento de los polimorfismos genéticos para los estudios de asociación genética.

Podemos definir un polimorfismo genético como la variación en un lugar determinado de la secuencia genética. Estos polimorfismos se heredan de una generación a otra siendo una herramienta muy valiosa para este tipo de estudios.

En el ADN podemos encontrar diferentes polimorfismos consistentes, por ejemplo, en la variación en un único nucleótido del ADN (SNP, de *single nucleotide polymorphism*, en inglés). Otros tipos de polimorfismos son los microsatélites y los minisatélites. Los microsatélites o

repeticiones cortas en tándem (STR, *short tandem repeats*, en inglés) son repeticiones cortas de 2-7 pares de bases (pb), repetidas de 2-10 veces. Y los minisatélites, también llamados repeticiones en tándem de número variable (VNTR, *variable number of tandem repeats*, en inglés) que son unidades de 20-50 repeticiones ⁽⁸⁰⁾.

No hay un consenso en relación a la elección del mejor marcador genético pero las variaciones genéticas más usadas en los estudios de asociación y las elegidas para esta tesis son los SNPs y los STRs.

Polimorfismos de un único nucleótido (SNPs):

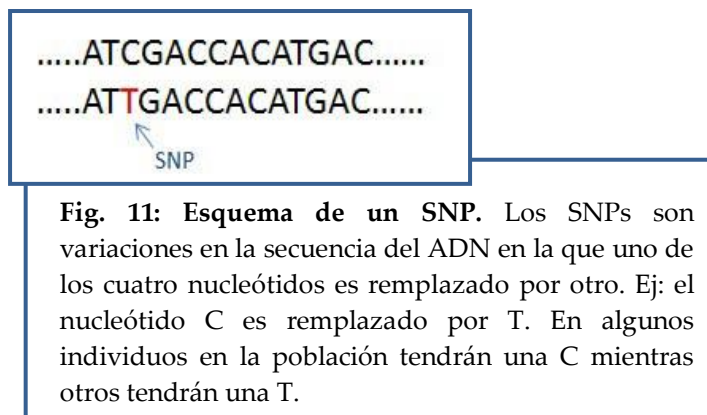
Son el tipo de polimorfismo más simple y más abundante dentro del genoma. Constituyen el 90% de las variaciones del genoma (10-15 millones de SNPs comunes en el ser humano) y aparecen en un promedio de 1 cada 100pb ⁽⁸¹⁾. Por esta razón son uno de los marcadores más elegidos para este tipo de estudios.

Podemos encontrar un registro de todos los SNPs en *Database of Single Nucleotide Polymorphisms* (dbSNP) del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

Se consideran comunes cuando su alelo menor es más frecuente del 1% ⁽⁸²⁾.

Más concretamente, consisten en la sustitución de un único nucleótido por otro dentro de la secuencia de nucleótidos del ADN (*fig. 11*).

La fuerte asociación entre varios SNPs que se heredan de forma conjunta en una región cromosómica da lugar a un **haplotipo**. Cuanto más cerca estén los SNPs, más posibilidades hay de que se hereden formando un haplotipo debido a que las posibilidades de recombinación disminuyen debido a la corta distancia.



El conocimiento de los haplotipos es útil debido a que, una vez conocidos los SNPs que se heredan juntos, sólo basta el estudio de uno de ellos para conocer el comportamiento de los demás (*fig. 12*).

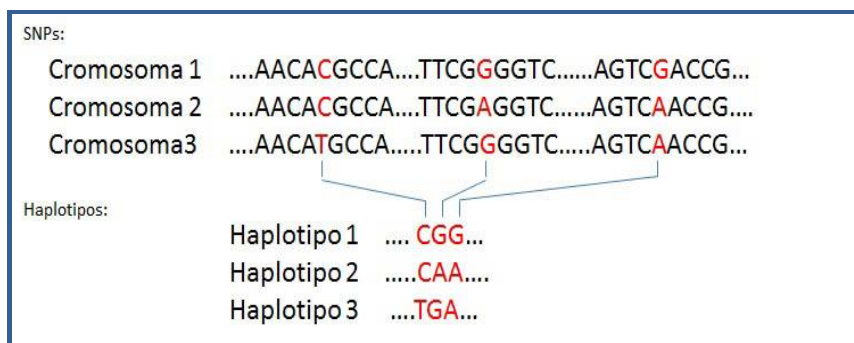


Fig. 12. Esquema de un haplotipo. La fila de los SNPs muestra una corta secuencia de ADN de tres individuos distintos. En la fila de los haplotipos vemos los 3 SNPs que forman parte de ese haplotipo. (*Figura adaptada de Nature 2003;426:789-795 (85)*).

Existe un consorcio, denominado *HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), cuyo objetivo es determinar o identificar grupos adecuados de variantes comunes, o haplotipos, en la secuencia del ADN del genoma humano, mediante la caracterización de las secuencias de las variantes, sus frecuencias y la asociación entre ellas.

Esto es de mucha utilidad para descubrir en un grupo de personas afectadas por una enfermedad, cuál es la variante alélica cuya frecuencia se ve aumentada al ser comparada con un grupo control no afectado (83).

Microsatélites (STRs):

Los microsatélites, también conocidos como STRs (*fig. 13*), consisten en repeticiones de secuencias cortas de ADN.

Fig. 13: Esquema de un STR.
 Un microsatélite o STR consiste en la repetición de un número variable de nucleótidos. En este ejemplo, observamos la repetición del trinucleótido CGT un número determinado de veces. Las diferentes posibilidades del número de repeticiones dan lugar a una alta variabilidad alélica.

Los STRs ocurren mayormente en regiones no codificantes del ADN y constituyen el 3% del genoma (84). Son altamente polimórficos debido a su alta tasa de mutación, lo que resulta importante para los estudios de asociación ya que aportan mayor número de alelos y cada uno de estos

alelos de tamaño diferente, a diferencia de los dos únicos posibles alelos que presentan los SNPs.

10. REALIZACIÓN ESTUDIOS ASOCIACION GENÉTICA.

Cuando se pretende llevar a cabo un estudio de asociación genética deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos para conseguir un buen diseño del experimento:

a) Cálculo del poder estadístico: Esto es fundamental para ser capaces de detectar las variantes causales de la enfermedad y determinar si un estudio alcanzará una precisión suficiente.

El poder estadístico es el cálculo de la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es realmente falsa ($1-\beta$), donde β es el error tipo II o el error cometido al aceptar la hipótesis nula cuando es falsa. Lo ideal es alcanzar un poder estadístico del 80-90% [\(85\)](#).

Existen factores que influyen en el poder estadístico como son:

- *Tamaño del efecto a detectar:* cuanto mayor sea el tamaño del efecto a detectar, mayor será la probabilidad de obtener hallazgos significativos.
- *Variabilidad:* cuanto mayor sea la variabilidad en la respuesta más difícil será detectar diferencias entre los grupos por lo que se recomienda estudiar grupos de muestra lo más homogéneos posibles.

- *Tamaño de muestra:* cuanto mayor sea, mayor será el poder estadístico. En estudios de muestras muy grandes se detectan, como significativas, diferencias que son poco relevantes para la enfermedad y en estudios con un tamaño de muestra pequeña es más fácil obtener falsos positivos.
- *Nivel de significación estadística:* habitualmente se trabaja con un nivel del 95% ($\alpha=0,05$). Si se disminuye el valor de α también se disminuye el poder de la prueba.

b) Colección de las muestras de ADN: La colección de la muestra es uno de los primeros pasos a realizar y, quizás, también el que más cuidados necesite ya que un error de base podría reflejar falsos resultados, hasta el punto en el que un gran número de muestras pobremente caracterizadas puede ser menos válido que un número de muestra bajo pero bien caracterizado.

Incluso cuando la enfermedad está bien caracterizada clínicamente, es importante preguntarse si el fenotipo de la enfermedad ha sido apropiadamente medido durante el estudio [\(86\)](#).

La definición del fenotipo es crucial para el estudio debido a que puede afectar a la perspectiva del análisis de asociación.

Por otro lado, una única entidad clínica o enfermedad puede estar asociada a muchas variantes alélicas, pero que clínicamente resultan

en la misma enfermedad. Esta situación es conocida como heterogeneidad genética.

Los estudios de asociación pueden ser realizados en familias o directamente en individuos no relacionados. Los individuos no relacionados son mucho más fáciles de reclutar, pero son susceptibles de estratificación de las poblaciones.

La estratificación de la población hace referencia a las diferencias étnicas que pueden aparecer dentro de una misma población. Esto debe ser valorado en nuestra colección de muestras para evitar falsos positivos.

Por lo tanto, la colección de muestras de los individuos sanos tiene que pertenecer a la misma población que los enfermos. La manera de evitar este problema en estudios de asociación de individuos no relacionados es eligiendo poblaciones que son homogéneas en términos de ancestralidad.

Otro parámetro a tener en cuenta es la proporción entre hombres y mujeres existente en la muestra, ya que ésta debe ser la misma tanto en controles como en los casos [\(79\)](#), así como la distribución de edad, sobre todo en las enfermedades de aparición tardía, donde se deben evitar errores que se puedan cometer con loci que afectan a la supervivencia de mayores.

c) Selección de las variantes génicas: Después de haber visto las diferentes variantes génicas que presenta el genoma humano debemos elegir cuáles de ellas vamos a utilizar en nuestro estudio.

No existe un consenso en relación a la utilización de SNPs u otras variantes para los estudios de asociación de genes candidatos. Lo que sí es evidente, debido a la gran variedad y cantidad de variantes génicas, es que no es eficiente el elegirlos de una manera azarosa.

Existen diversas estrategias que pueden ayudar a la hora de decidirse por una variante genética y estudiar su asociación con una enfermedad.

Una de las estrategias consiste en estudiar genes que han sido encontrados en regiones de susceptibilidad a la enfermedad detectadas en modelos animales o comparando pacientes con población sana; y la otra estrategia consiste en estudiar genes que puedan tener una implicación en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Estas dos estrategias no son excluyentes, sino complementarias entre sí.

Los marcadores más utilizados suelen ser los SNPs y los STRs y, de éstos, aquellos que son capaces de alterar la función de la proteína son los mejores candidatos a la hora de plantear el estudio.

La elección de un buen gen candidato para la EM resulta un problema debido al desconocimiento de su etiología y fisiopatología, así como

por la falta de existencia de modelos animales específicos para esta enfermedad [\(87\)](#).

Hay que prestar especial atención a la herencia conjunta de alelos en forma de haplotipos, conocido como desequilibrio de ligamiento (LD, *linkage disequilibrium*, en inglés). El LD es la asociación de alelos de dos o más loci que se heredan de manera no azarosa, en una proporción diferente a como cabría esperar. Debido a que pueden aparecer asociaciones causadas por un LD entre los marcadores y la enfermedad hay que prestar especial atención a éstos. El LD puede medirse entre dos loci, A y B, con dos alelos cada uno, usando la siguiente fórmula:

$$D = f(A_1B_1) - f(A_1) f(B_1), \text{ donde:}$$

* $f(A_1B_1) \rightarrow$ frecuencia del haplotipo observado del alelo 1 de ambos loci A y B.

* $f(A_1) f(B_1) \rightarrow$ frecuencia esperada del haplotipo

Normalmente el LD es medido en valores de D' y r^2 , cuyos valores se acercan a 1 cuando el ligamiento es completo.

» $D' = D/D_{max}$. \rightarrow valores normalizados de desequilibrio de ligamiento.

» $r^2 =$ coeficiente de correlación entre los dos SNPs.

La importancia de todo esto reside en que cuando unos SNPs se encuentran en LD el simple hecho de examinar una minoría de ellos sería suficiente para conseguir la información de toda la región [\(88\)](#).

d) Genotipado de las muestras: Los errores del genotipado deben ser validados en los estudios de asociación genética.

El genotipado puede que haya sido erróneo si existe algún problema con las muestras o con la aplicación de las técnicas de laboratorio.

Un método para detectar los errores en el genotipado es la comprobación del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en nuestras poblaciones [\(89,90\)](#).

Se dice que una población está en equilibrio cuando muestra las características básicas de la ley EHW:

$$\text{EHW} = (p^2 + 2pq + q^2 = 1).$$

Se determinan de esta forma qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos y se comparan las frecuencias observadas para cada uno de los genotipos con las teóricas esperadas si se cumpliera el dicho equilibrio. Finalmente se aplica la prueba estadística Chi cuadrado (χ^2) para determinar si existen o no diferencias significativas entre ambas.

En el caso que los controles no cumplieran esta ley se debería revisar el método de genotipado, pues suele ser el error más habitual, o eliminarse directamente esos resultados [\(86\)](#).

e) Análisis de interpretación: Los resultados del análisis deben ser ajustados para las comparaciones múltiples. De hecho, suele ser el principal motivo de la detección de falsos positivos. Los valores de p deberán ser corregidos para evitar esto. El método más sencillo para corregir este problema es el método de Bonferroni, en el que el valor de p debe ser multiplicado por el número de comparaciones que se lleven a cabo en el estudio.

Aún después de todo esto, hasta que los resultados no consiguen ser replicados en otras poblaciones independientes, debemos interpretar los resultados con precaución.

Los estudios de replicación se deben realizar con un tamaño de muestra adecuado y deben ser realizados en grupos de datos independientes en los que se analice el mismo o similar fenotipo [\(91\)](#).

Los estudios de replicación son muy importantes y son un paso crítico a realizar antes de comenzar a explorar estudios funcionales para determinar las bases fisiopatológicas de una asociación genética.

f) Confirmación de nuestro gen candidato: después de todo este proceso, nuestro gen candidato deberá ser confirmado de alguna de las siguientes formas:

- i. Screening de mutación:* El screening de mutaciones específicas del paciente en el gen candidato es el método más popular porque es

de fácil reproductibilidad y aplicación. La búsqueda de genes candidatos revelarán muchas variantes diferentes, y decidir si son o no patológicas es una tarea difícil.

- ii. *Restablecimiento del fenotipo normal in vitro*: Si un fenotipo mutante es demostrable en células podemos comprobar si la transfección de un alelo normal del gen candidato, clonado en un vector de expresión, es capaz de rescatar al mutante y restaurar el fenotipo normal.
- iii. *Producción de un modelo animal de la enfermedad*: Se puede generar el fenotipo de la enfermedad mediante ratones *knock-in* y estudiar la función del gen mediante ratones *knock-out*. El alelo enfermo puede ser introducido al ratón y se debe esperar en el ratón la producción de los síntomas de la enfermedad, aunque no siempre esto funciona.

11. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO.

Un estudio de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome wide association study*, en inglés) es un estudio que analiza a la vez una gran cantidad de variantes genéticas en diferentes individuos para averiguar si alguna de las variantes está asociada con una enfermedad en concreto. Normalmente son estudios realizados con SNPs y comparan dos grupos

de individuos, casos y controles, pero también existen trabajos realizados con otros tipos de variantes génicas.

El primer estudio de GWAS se publicó en el año 2005 y supuso el comienzo de una nueva era en los estudios genéticos de enfermedades complejas [\(92\)](#).

Hasta la fecha no existe ningún GWAS realizado en la EM [\(93\)](#). Sí se han podido asociar, mediante estudios de este tipo, variantes génicas a otras patologías del oído interno, tal es el caso de la presbiacusia en la cuál se han visto dos genes fuertemente implicados: IQGAP2 que es expresado en el interior de la cóclea y está implicado en la adhesión de las células mediadas por cadherinas; y el otro gen fue el GRM7, cuya expresión se ha observado en las células ciliadas internas y externas y en las células del ganglio espiral del oído interno, y codifica para un receptor de glutamato, que es el neurotransmisor más importante de las células ciliadas cocleares [\(94\)](#).

Si la fisiopatología de la EM es desconocida, la de la migraña asociada al vértigo o su relación con la EM es aún más confusa, pero no deja de plantearse la existencia de una relación entre ambas patologías [\(95\)](#). Existen GWAS que han estudiado asociación genética con los enfermos de migraña y han comprobado la relación de diversos genes con esta enfermedad, entre otros, el gen PRDM16 (codifica un factor de

transcripción con dedo de zinc), TRPM8 (receptor de potencial transitorio M8) y LRP1 (un receptor endocítico) [\(96\)](#).

12. BIBLIOGRAFIA.

1. Baloh RW. Prosper Ménière and his disease. *Arch Neurol* 2001;58(7):1151-6.
2. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181-185.
3. Colman BH (1971). Meniere Disease. En: Ballantyne J Groves (eds.). *Diseases of the Ear, Nose and Throat*, London, Butterworths, p.589-629.
4. Harper LA, McCabe BF (1982). Enfermedad de Meniere y otros trastornos laberínticos periféricos. En: Paparella MM, Shumrick DA (eds.). *Otorrinolaringología*, Buenos Aires, Panamericana, p.1864-76.
5. House JW, Doherty JK, Fisher LM et al. Ménière's Disease: Prevalence of contralateral ear involvement. *Otol Neurotol* 2006;27:355-61.
6. Lopez-Escamez JA, Viciano D, Garrido-Fernandez P. Impact of bilaterality and headache on health-related quality of life in Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118(6):409-16.
7. Eriksson-Mangold M, Carlsson SG. Psychological and somatic distress in relation to perceived hearing disability, hearing handicap, and hearing measurements. *J Psychosom Res* 1991;35:729-40.
8. Crujisen N, Dullaart R, Wit Hero et al. Analysis of cortisol and other stress-related hormones in patients with Meniere's disease. *Otology & Neurotology* 2005;26:1214-19.
9. Sekine K, Morita K, Masuda K et al. Microarray analysis of stress-related gene expression in patients with Meniere's disease. *ORL* 2005;67:294-99.
10. Zapata C, Lopez Escamez JA. A pilot study of sexual health in patients with Meniere's disease. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2011;62(2):119-25.
11. Nakayama M, Suzuki M, Inagaki A et al. Impaired quality of sleep in Meniere's disease patients. *J Clin Sleep Med* 2010;6(5):445-9.

12. Saeed SR. Fortnightly review: diagnosis and treatment of Meniere's disease. *BJM* 1998;316:368-72.
13. Alexander TH, Harris JP. Current epidemiology of Meniere's syndrome. *Otolaryngol Clin North Am* 2010;43(5):965-70.
14. Da Costa SS. Central causes of vertigo (1997). En: Souza SD, Claussen C (eds). *Modern concepts of neurology*. Mumbai, Prajakta Arts, p.310-331.
15. Rubio A, Morales C. Concepto y epidemiología de la enfermedad de Meniere (2009). En: Perez-Garrigues H, Lopez-Escamez JA, Morales C, Perez N (eds). *Enfermedad de Meniere: desde las ciencias básicas hasta la medicina clínica*. Badalona, Euromedice, p.115-122.
16. Morrison AW, Johnson KJ. Genetics (molecular biology) and Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am* 2002;35:497-516.
17. Perez-Vazquez P. Diagnóstico de la enfermedad de Meniere. Valoración auditiva (2009). En: Perez-Garrigues H, Lopez-Escamez JA, Morales C, Perez N (eds). *Enfermedad de Meniere: desde las ciencias básicas hasta la medicina clínica*. Badalona, Euromedice, p.197-207.
18. Thirlwall AS, Kundu S. Diuretics for Ménière's disease or syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;19;3:CD003599.
19. Barrs DM. Intratympanic injections of dexamethasone for long-term control of vertigo. *Laryngoscope* 2004;114:1910-1914.
20. Chia SJ, Gamst A, Anderson J *et al*. Intratympanic gentamicin therapy for unilateral Meniere's disease: a meta-analysis. *Otol Neurotol* 2004; 25:544-52.
21. Martín E, Pérez N. Hearing loss after intratympanic gentamicin therapy for unilateral Meniere's disease. *Otol Neurotol* 2003;24:800-6.
22. Gross ND, Kempton JB, Trune DR. Spironolactone blocks glucocorticoid-mediated hearing preservation in autoimmune mice. *Laryngoscope* 2002;112(2):298-303.
23. Bitner-Glindzicz M, Rahman S. Ototoxicity caused by aminoglycosides. *BMJ* 2007;335(7624):784-5.

24. Gottshall KR, Hoffer ME, Moore RJ *et al.* The role of vestibular rehabilitation in the treatment of Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;133:326-8.
25. Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R *et al.* Math 1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 2003; 23:4395-4400.
26. Hegarty JL, Kay AR, Green SH. Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and is additive with that by neurotrophins or cAMP and requires elevation of Ca²⁺ within a set range. *J Neurosci* 1997;17:1959-70.
27. Chikar JA, Colesa DJ, Swiderski DL *et al.* Over-expression of BDNF by adenovirus with concurrent electrical stimulation improves cochlear implant thresholds and survival of auditory neurons. *Hear Res* 2008;245(1-2):24-34.
28. Kawamoto K, Sha SH, Minoda R *et al.* Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol Ther* 2004;9(2):173-81.
29. Hildebrand M, Newton S, Gubbels S *et al.* Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Mol Ther* 2008;2:224-36.
30. Kelley MW. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(11):837-49.
31. Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol* 2006;576:11-21.
32. Semmaan MT, Alagramam KN, Megerian CA. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. *Curr opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:301-7.
33. Merchant SN, Adams JC (2009) Histopatología de la enfermedad de Meniere. En: Perez-Garrigues H, Lopez-Escamez JA, Morales C, Perez N (eds). *Enfermedad de Meniere: desde las ciencias básicas hasta la medicina clínica*. Badalona, Euromedice, p. 59-66.
34. Boudewyns A, Claes J. Acute cochleovestibular toxicity due to topical application of potassium iodide. *Eur Arch Otorhino-laryngol* 2001; 258:109-11.

35. Michel O, Hess A, Su J *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS2) in the hydropic cochlea of guinea pigs. *Hear Res* 2000;143:23-8.
36. Kimura RS. Animal models of endolymphatic hidrops. *Am J Otolaryngol* 1982;3:447-51.
37. Rauch SD, Velazquez-Villaseñor L, Dimitri PS *et al.* Decreasing hair cell counts in aging humans. *Ann N Y Acad Sci* 2001;942:220-7.
38. Shinomori Y, Kimura RS, Adams JC. Changes in immunostaining for Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransporter 1, taurine and c-Jun N-terminal kinase in experimentally induced endolymphatic hydrops. *ARO Abstr* 2001;24:134.
39. Yoda S, Cureoglu S, Shimizu S *et al.* Round window membrane in Ménière's disease: a human temporal bone study. *Otol Neurotol* 2011;32(1):147-51.
40. Semaan MT, Alagramam KN, Megerian CA. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:301-307.
41. Momim SR, Melki SJ, Alagramam KN *et al.* Spiral ganglion loss outpaces inner hair cell loss in endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 2010;120:159-165.
42. Arnold W, Niedermeyer HP. Herpes simplex virus antibodies in the perilymph of patients with Meniere disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123(1):53-6.
43. Nacci A, Dallan I, Monzani F *et al.* Elevated antithyroid peroxidase and antinuclear autoantibody titers in Meniere's disease patients: more than a chance association? *Audiol Neurotol* 2010;15(1):1-6.
44. En Murphy, Kenneth P. (2012) *Janeway's immunobiology*. Galard Science, Taylor & Francis Group, LLC.
45. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996;85(3):311-8.

46. Saiah I, Benini V, Daniel S *et al.* Linkage disequilibrium between HLA class II and antigen processing genes of the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* 1996;48(2):87-92.
47. Xenellis J, Morrison AW, McClowskey D *et al.* HLA antigens in the pathogenesis of Menière's disease. *J Laryngol Otol* 1986;100(1):21-4.
48. McCabe B. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;88:585-89.
49. Lorenz RR, Solares CA, Williams P *et al.* Interferon gamma production to inner ear antigens by T cells from patients with autoimmune sensorineural hearing loss. *J. Neuroimmunol* 2002;130:173-8.
50. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990; 100:516-24.
51. Ranch SD, San Martin JE, Moscicki RA *et al.* Serum antibodies against heat shock protein in Meniere's disease. *Am J. Otol* 1995;16:648-52.
52. Shin SO, Billings PB, Keithley EM *et al.* Comparisson of anti-heat shock protein 70 (anti-hsp 70) and anti-68kD inner ear protein in the sera of patients with Meniere's disease of anti-heat shock protein 70 (anti-hsp 70) and anti-68kD inner ear protein in the sera of patients with Meniere's disease. *Laryngoscope* 1995;105:1347-52.
53. Süslü N, Yılmaz T, Gürsel B. Utility of immunologic parameters in the evaluation of Meniere's disease. *Acta Oto-Laryngologic* 2009;129:1160-5.
54. Cheng KC, Matsuoka H, Lee KM. Proto-oncogene raf-1 as an autoantigen in Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1093-8.
55. Brookes GB. Circulating immune complexes in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112(5):536-40.
56. Cao MY, Gersdorff M, Deggouj N *et al.* Detection of inner ear disease autoantibodies by immunoblotting. *Mol Cell Biochem* 1995;146(2):157-63.

57. Adams JC. Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: a technical note. *Otol Neurotol* 2002;23(3):316-22.
58. Tomoda K, Suzuka Y, Iwai H *et al.* Menière's disease and autoimmunity: clinical study and survey. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993;500:31-4.
59. Fattori B, Nacci A, Dardano A *et al.* Possible association between thyroid autoimmunity and Menière's disease. *Clin Exp Immunol* 2008 ;152(1):28-32.
60. Sone M, Schachern PA, Paparella MM *et al.* Study of systemic lupus erythematosus in temporal bones. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol* 1999;108:338-344.
61. Birgeron L, Gustavson KH, Stahle J. Familial Ménière's disease: a genetic investigation. *Am J Otol* 1987;8:323-6.
62. Morrison AW, Mowbray JF, Williamson R *et al.* On genetic and environmental factors in Meniere's disease. *Am J Otol* 1994;15(1):35-9.
63. Mizukoshi K, Ino H, Ishikawa K *et al.* Epidemiological survey of definite cases of Meniere's disease collected by the seventeen members of the Meniere's disease research committee of Japan in 1975-1976. *Adv Otorhinolaryngol* 1979;25:106-11.
64. Brown MR. The factor of heredity in labyrinthine deafness and paroxysmal vertigo; Meniere's syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1949;58(3):665-70.
65. Bernstein JM. Occurrence of episodic vertigo and hearing loss in families. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1965;74(4):1011-21.
66. Robertson NG, Skvorak AB, Yin Y *et al.* Mapping and characterization of a novel cochlear gene in human and in mouse: a positional candidate gene for a deafness disorder, DFNA9. *Genomics* 1997; 46: 345-54.
67. Robertson NG, Resendes BL, Lin JS *et al.* Inner ear localization of mRNA and protein products of COCH, mutated in the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2493-2500.

68. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI *et al.* High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999;8:1425-9.
69. Usami S, Takahashi K, Yuge I *et al.* Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet* 2003;11(10):744-8.
70. Sanchez E, Lopez-Escamez JA, Lopez-Nevot MA *et al.* Absence of COCH mutations in patients with Meniere disease. *Eur J Hum Genet* 2004;12(1):75-8.
71. Lunch M, Cameron TL, Knight M *et al.* Structural and mutational analysis of antiqunin as a candidate gene for Meniere's disease. *Am. J. Genet* 2002;110:397-9.
72. Teggi R, Lanzani C, Zagato L *et al.* Gly460Trp α -Adducin mutation as a possible mechanism leading to endolymphatic hydrops en Meniere's syndrome. *Otol Neurotol* 2008;29:824-8.
73. Kawaguehi S, Hagiwaña A, Suzuki M. Polymorphic analysis of the heat shock protein 70 gene (HSPA1A) in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol* 2008;128:1173-7.
74. López Escámez JA, Moreno A, Bernal M *et al.* Poly (ADP-Ribose) polymerase-1 (PARP-1) longer alleles spanning the promoter region may confer protection to bilateral Meniere's disease. *Acta Oto-Laryngol* 2009; 129:1222-25.
75. Rawal SG, Thakkar KH, Ziai K *et al.* HLA-B27-associated bilateral Meniere disease. *Ear Nose Throat J* 2010;89:122-7.
76. Yeo SW, Park SN, Jeon EJ *et al.* Influence of human leukocyte antigen in the pathogenesis of Meniere's disease in the South Korean population. *Acta Otolaryngol* 2002;122:851-6.
77. Koyama S, Mitsuishi Y, Bibee K *et al.* HLA associations with Meniere's disease. *Acta Otolaryngol* 1993; 113:575-8.

78. López Escámez JA, Vilchez JR, Soto-Varela *et al.* HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Meniere's disease in Southern European population. *Otol Neurotol* 2007;28:891-5.
79. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *The Lancet* 2005;366(9493):1315-23.
80. Passarge E, Bumashny V Bases moleculares de la genética. (eds). *En: Genética: texto y atlas*. Madrid, Medica Panamericana, p.30-94.
81. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med* 2005;56:303-20.
82. Lela Buckingham (2012). *En: Molecular diagnostics: fundamentals methods and clinical applications* (eds). Philadelphia, FA. Davis Co.
83. The international hapmap consortium. The international Hapmap Project. *Nature* 2003;426:789-95.
84. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004;5(6):435-45.
85. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003;19(1):149-50.
86. Attia J, Ioannidis J, Thakkinstian A *et al.* How to use an article about genetic association. *JAMA* 2009;301(2):191-197.
87. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002;3(5):391-7.
88. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437(7063):1299-1320.
89. Tiret L, Cambien F. Departure from Hardy-Weinberg equilibrium should be systematically tested in studies of association between genetic markers and disease. *Circulation* 1995;92(11):3364-5.

90. Salanti G, Amountza G, Ntzani EE *et al.* Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies an empirical evaluation of reporting, desviations and power. *Eur J Hum Genet* 2005;13(8):840-8.
91. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M *et al.* Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007;447:655-660.
92. Ku CS, Loy EY, Pawitan Y *et al.* The pursuit of genome-wide association studies:where are we now? *J Hum Genet* 2010;55(4):195-206.
93. Hindorff LA, MacArthur J, Wise A *et al.* A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Available at: www.genome.gov/gwastudies.
94. Van Laer L, Huyghe JR, Hannula S *et al.* A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *Eur J Hum Genet* 2010;18(6):685-93.
95. Radtke A, Lempert T, Gresty MA *et al.* Migraine and Meniere's disease: is there a link? *Neurology* 2002;59(11):1700-4.
96. Chasman DI, Schurks M, Anttila V *et al.* Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 2011;43(7):695-8.

Justificación y Objetivos

En la EM, una enfermedad compleja cuya etiología es desconocida, una base genética y autoinmune es sospechada. Cualquier enfermedad autoinmune sigue un patrón genético y entre ellas comparten genes implicados en procesos desencadenantes de la autoinmunidad. Si las sospechas de autoinmunidad en la EM son ciertas, los marcadores genéticos encontrados en diversas enfermedades autoinmunes también deberían aparecer asociados a la EM.

La asociación de marcadores genéticos con la EM permitirá distinguir a los pacientes y poder realizar consejo genético o conocer el pronóstico de cada uno de ellos individualmente, suministrando así un tratamiento personalizado en cada caso.

Claude Bernard ya dijo hace 150 años que “no existen enfermedades sino enfermos” y es demostrado hoy día que los fármacos actúan de manera diferente según el tipo de paciente. En definitiva, la dotación genética del paciente es parte fundamental de su respuesta al tratamiento.

Hasta hoy, el tratamiento y la dosis adecuada son administrados en base a los resultados de ensayos clínicos aleatorizados frente a placebo, pero en el futuro, la utilización de determinaciones farmacogenéticas permitirá definir a priori el tratamiento a suministrar en cada caso.

Conocer la predisposición genética de la enfermedad también permitirá, entre otras cosas, conocer un factor de riesgo más para padecer la enfermedad y conocer este riesgo nos permitirá disminuirlo mediante el seguimiento de los familiares de nuestros pacientes. Los familiares de los enfermos de Meniere, gracias a la medicina predictiva podrán ser identificados en el caso de padecer predisposición a desarrollar la enfermedad.

La ciencia que posibilita todo esto es la genómica, que está dedicada al estudio de la estructura, el funcionamiento y la evolución de los genomas. Esta ciencia ha tenido un gran auge en los últimos años y han contribuido al avance de distintos campos de la ciencia entre los que se encuentra la medicina.

Por todas estas razones, parece obvia la importancia del conocimiento de las características genéticas de las enfermedades hereditarias, por lo que se han planteado los siguientes objetivos.

Los **objetivos** de esta tesis doctoral son:

1. Estimar la agregación familiar en la enfermedad de Meniere.
2. Calcular la prevalencia de enfermedades autoinmunes en los enfermos de Meniere.
3. Determinar si los genes HLA están asociados a la enfermedad de Meniere en la población española.
4. Evaluar si los polimorfismos más estudiados en otras enfermedades autoinmunes de los genes MICA, $INF\gamma$, MIF, $TNF\alpha$, iNOS, CTLA4 Y PTPN22 están asociados a la enfermedad de Meniere en la población española.

Capítulo II: Predisposición autoinmune y genética

1. INTRODUCCIÓN.

Para la mayoría de las EAs la herencia de ciertas moléculas HLA es la influencia genética más potente, aunque los mecanismos mediante los que este fenómeno se produce no están aún muy claros. También se ha demostrado la importancia de otros genes inmunológicamente relevantes, como son algunos genes del sistema del complemento y algunos polimorfismos en el receptor Fc de las Igs en el LES, y segmentos de genes de los TCR y de las Igs en una variedad de enfermedades [\(1\)](#).

Aunque los genes asociados varían entre las distintas EAs, existen algunos genes comunes a varias de ellas [\(2\)](#) y la predisposición genética es incuestionable, habiéndose demostrado una fuerte agregación familiar y una mayor prevalencia de la enfermedad en parejas de hermanos gemelos homocigóticos que en hermanos dicigóticos no idénticos [\(3\)](#).

Un método para medir la agregación familiar es el ratio o razón de riesgo de recurrencia entre hermanos (λ_s), que es definido como la razón del riesgo de que se manifieste la enfermedad cuando uno de los hermanos ya está afectado, comparado con la prevalencia de dicha enfermedad en la población general [\(4\)](#).

La autoinmunidad es la pérdida de tolerancia inmunológica hacia los constituyentes propios, definiéndose la tolerancia inmunológica como la incapacidad controlada para responder a los componentes propios ⁽⁵⁾.

Una EA es una condición en la que los tejidos sufren daños causados por la actuación de las células T o los Acs contra el propio organismo. Los Ac pueden inducir daño por su unión directa a los Ags y la posterior activación del complemento, por bloqueo o estimulación de un receptor o por el daño producido por los inmunocomplejos circulantes (CIC) ⁽⁵⁾.

Hay una serie de características comunes a todas las enfermedades autoinmunes:

- presencia de autoinmunidad mediada por linfocitos T o B (presencia de CIC).
- respuesta clínica apropiada a la inmunodepresión (tratamiento anti-linfocitos B).
- la transferencia pasiva del posible efector inmunitario provoca la enfermedad.
- existencia de un modelo animal similar a la enfermedad humana en el que se produzca una pérdida similar de la tolerancia.
- asociación con variantes alélicas funcionales de la molécula del HLA de clase I y II, que determinan la presentación y reconocimiento de antígenos.

Los mecanismos autoinmunes aparecen asociados con la fisiopatología de la EM desde hace tiempo [\(6-7\)](#). Además, existen otras evidencias para apoyar esta hipótesis como ya se vio en el Capítulo I.

Las EAs suelen ser enfermedades complejas en las que están implicados múltiples genes y un gen en particular no es suficiente para determinar el desarrollo de la enfermedad. El hecho de que cada alelo de un gen contribuya tan poco a la expresión fenotípica de la enfermedad es lo que las convierte en enfermedades complejas y es la principal razón para que su estudio sea complicado.

El principal propósito de este capítulo va destinado a estimar la λ_s de la enfermedad, así como la prevalencia de EAs en nuestros pacientes, lo que ayudará a entender mejor la posible predisposición genética y autoinmune de la EM.

2. MATERIALES Y METODOS.

Pacientes

Un total de 690 pacientes con EM definitiva (217 bilaterales y 473 unilaterales) diagnosticados por otoneurólogos de seis centros de referencia de toda España, conforme a la AAO-NHS [\(8\)](#), fueron incluidos para nuestro estudio desde Octubre de 2007 hasta Mayo de 2011.

Todos los pacientes fueron informados mediante un consentimiento informado (*Anexo I*) y sus datos clínicos fueron anonimizados para su

uso de forma agregada cumpliendo los acuerdos de la Declaración de Helsinki [\(9\)](#) y la Ley de Investigación Biomédica [\(10\)](#).

La finalidad del consentimiento es asegurar que los individuos participen en la investigación clínica sólo cuando ésta sea compatible con sus valores, intereses y preferencias. El consentimiento incluía información sobre la finalidad y los riesgos de la investigación, respetando así a la persona y su autonomía, permitiendo a los pacientes cambiar de opinión y retirarse en cualquier momento de la investigación y su privacidad es respetada utilizando reglas de confidencialidad.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de Poniente, El Ejido, Almería.

Anamnesis y exploración otoneurológica

La anamnesis fue orientada para conocer el número y la duración de los episodios de vértigo, la presencia y tipo de cefaleas sufridas y la pérdida de audición experimentada en los últimos meses.

Los exámenes diagnósticos consistieron en audiometrías de tonal y timpanometrías. Se examinó también el nistagmo en la posición primaria, el nistagmo inducido por agitación cefálica, y el test del impulso. La exploración instrumental incluyó una prueba calórica bitérmica y los potenciales evocados vestibulares, que fueron realizados dentro de la práctica clínica habitual para evaluar la función vestibular.

El estadio auditivo se definió a partir del promedio del umbral tonal para las frecuencias de 0.5, 1, 2 y 3 kHz en relación al criterio de la AAO-HNS (8).

En los pacientes con EM bilateral, la hipoacusia neurosensorial fue considerada metacrónica, cuando transcurrió un tiempo mínimo de un mes desde la afección de un oído a la aparición de hipoacusia en el otro, y sincrónica cuando la afección se produce de forma simultánea.

La frecuencia y la duración de los episodios de vértigo fueron considerados cuando la duración de las crisis fue superior a 20 minutos como se describe en la clasificación de la AAO-NHS (8).

El diagnóstico también incluyó una resonancia magnética del cerebro para excluir otras causas posibles de los síntomas neurológicos.

Se investigó especialmente la existencia de otras comorbilidades como otras EAs o sistémicas y cefalea migrañosa. Así, se preguntó si el paciente había experimentado síntomas de alguna condición autoinmune y el diagnóstico de las EAs fue realizado por reumatólogos o por especialistas en Medicina Interna, de acuerdo con los criterios de la *American College of Rheumatology* (<http://mail3.rheumatology.org/practice/index.asp>).

El diagnóstico de migraña o de cefalea tensional fue realizado de acuerdo a la clasificación de la *International Headache Society* publicada en 2004 (<http://ihs-classification.org/en/>).

Se recogieron las siguientes variables clínicas: sexo, edad de inicio de la enfermedad, enfermedad unilateral o bilateral, oído afectado, nivel de pérdida de audición en el diagnóstico, estadio de la audición, frecuencia del vértigo durante los últimos 6 meses, crisis de Tumarkin, escala funcional, duración de los ataques, tiempo transcurrido desde el último ataque de vértigo, así como el consumo de tabaco y/o de café.

Se hizo especial interés en la presencia de familiares afectados de EM para la estimación del coeficiente de agregación familiar.

Criterios de exclusión

Los pacientes con migraña vestibular, vértigo posicional paroxístico benigno, neuritis vestibular, trauma craneal, cirugía del oído, infección recurrente del oído medio, neurinoma acústico y pacientes que experimentaron vértigo con una duración inferior a 20 minutos fueron excluidos del estudio.

Cálculo de la agregación familiar

$$\lambda_s = \frac{P(\text{sib2D} \mid \text{sib1D})}{p}$$

* $P(\text{sib2D} \mid \text{sib1D})$ = prevalencia de hermanos afectados con EM.

* D = denota que un individuo está afectado por la enfermedad.

* p = prevalencia de la EM en la población.

Una desviación significativa de la unidad en esta medida sugiere agregación familiar [\(11\)](#).

Cálculo de la prevalencia de EAs en nuestros pacientes

$$\text{Prevalencia de EA} = \frac{\text{Pacientes que presentan alguna EA}}{\text{Pacientes que fueron preguntados}}$$

Evaluación inmunoserológica

Se extrajo suero de los pacientes desde sangre periférica mediante procedimientos estándar.

Los ANA comprenden una gran variedad de Acs contra distintos constituyentes del núcleo de la célula, como son el ADN, el ARN y otras proteínas nucleares.

Estos ANA fueron detectados mediante la utilización de células HEp-2 que son usadas como sustrato, en las que los ANA del suero de los pacientes se unen a los Acs correspondientes presentes en las células HEp-2. La ventaja de estas células es que poseen núcleos grandes y orgánulos fáciles de ver. Después, estos Acs se ponen de manifiesto mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) mediante incubación con un Ac contra Igs humanas conjugado con fluoresceína.

El screening de los ANA fue considerado positivo cuando el título fue de 1/160. Cuando el resultado es positivo se necesita continuar en busca de

los Ags serológicos específicos asociados, para lo cual es necesario realizar un ELISA.

Un ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, en inglés) es una técnica basada en la especificidad Ag-Ac y se basa en la detección de una reacción inmunológica en un soporte sólido. La identificación de los complejos (Ag-Ac) se hace mediante enzimas, bien unidas al Ag o al Ac. A esta enzima se le agrega posteriormente un sustrato cromógeno. Este sustrato cromógeno es medido por espectrofotometría cuantificando la cantidad de producto enzimático marcado, que hace referencia a la reacción Ag-Ac del inicio.

Para el análisis de los ANA, usamos el kit DIASTAT™ para la detección de Ags de centrómero, histona, Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1 y dsDNA.

Los kits EliA dsDNA y EliA Symphony (*Pharmacia Diagnostics*, Freiburg, Alemania) fueron usados para medir las concentraciones de estos Ags.

Las proteínas *c3* y *c4* del sistema del complemento y las Igs (*IgG*, *IgM*, *IgA*) se midieron mediante inmunoturbidimetría que mide la dispersión de la luz provocada por los complejos Ag-Ac, en un sistema OLYMPUS AU5400.

Para medir las concentraciones de CIC (C1q) se usó un kit de ELISA (HYCOR, *Agilent Technologies*, Amstelveen, Holanda). Los valores por

encima de +3SD (desviación estándar) de la media se consideraron como positivos.

Las *poblaciones linfocitarias* se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro Coulter EPICS XL-MCL. La fluorescencia usada fue CD3-PC5/CD4-FITC/CD8-PE.

Cuantificación serológica

Se midieron las concentraciones de las citoquinas $INF\gamma$ y $TNF\alpha$ en suero de los pacientes mediante una ELISA (Biosource™, Nivelles, Bélgica).

Las pruebas analíticas fueron realizadas en la fase quiescente de la enfermedad, al menos cuatro semanas después del último episodio de vértigo.

Análisis estadístico

Se analizaron las medias y las desviaciones estándar de todas las variables con el programa estadístico SPSS v15 (SPSS, Chicago, IL).

Las variables cualitativas fueron comparadas mediante la prueba de la χ^2 de Pearson con la corrección de Yates cuando fue necesario y el test de Fischer se usó cuando el número de casos era <5%.

Las variables cuantitativas (edad, tiempo de duración de la enfermedad y tiempo transcurrido desde la última crisis) se analizaron mediante el test de la t de Student.

La evolución del estado de la audición, los episodios de vértigo y las crisis de Tumarkin fueron determinadas mediante el método de Kaplan-Meier y para comparar las curvas de supervivencia se usó el test log-rank.

Usando el valor de la pérdida de audición y la frecuencia de episodios de vértigo en los últimos seis meses como variables dependientes, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para investigar los factores asociados con la pérdida de audición y la frecuencia del vértigo en los pacientes con EM.

La significación estadística fue considerada a partir de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS.

El coeficiente λ_s de agregación familiar de nuestros pacientes pudo ser calculado en un subgrupo de 372 pacientes, dieciséis de ellos contaban con un hermano o hermana también afectado de EM. La proporción de enfermos con hermanos afectados fue de $16/372=0,043$, reflejando una frecuencia del 4,3% de casos con hermanos afectados.

La prevalencia de la EM en la población española está estimada en $75/100.000=0,00075$, según los resultados de un estudio epidemiológico realizado en España con población cántabra [\(12\)](#).

Por tanto, la λ_s de nuestros pacientes fue de:

$$\lambda_s = 0,043 / 0,00075 = 57$$

El λ_s estimado para la EM en nuestros pacientes fue de 57, indicando la presencia de una fuerte agregación familiar.

Para confirmar este resultado reanalizamos de nuevo el coeficiente de agregación utilizando un valor de prevalencia más estricto. Al tomar como prevalencia la prevalencia estudiada en la población norteamericana de origen caucásico [\(13\)](#), 146/100.000, el valor de λ_s fue 29.

También evaluamos la proporción de enfermos que tenían algún familiar afectado (de primer, segundo o tercer grado), y dicho valor fue de $34/372=0,091$, mostrando una frecuencia del 9,1% de los enfermos que presentan una historia genética de la enfermedad dentro de las familias.

El siguiente paso fue analizar la prevalencia de EAs en los enfermos, así como algunas características clínicas de éstos. La edad en el momento de la inclusión en el estudio o la edad de comienzo de la enfermedad entre los pacientes de los diferentes centros no reflejaron diferencias (*tabla 1*).

Sin embargo, el porcentaje de mujeres incluido por cada centro resultó ser diferente (51,0-71,2; $p=0,001$). El porcentaje de pacientes con hipoacusia neurosensorial bilateral fue diferente en cada centro (9,6-47,5; $p=2,1 \times 10^{-8}$). Del total de pacientes, el 40% fueron bilaterales y el 60% unilaterales (32% afectados del oído izquierdo. y 28% afectados del oído derecho). La muestra no representa el porcentaje real de enfermos con EM uni o bilaterales observado en cada clínica, pues fueron incluidos más enfermos con afectación bilateral para que la comparación clínica

entre ambos grupos (unilaterales y bilaterales) fuese lo más equitativa posible.

Centro	Edad*	Edad de inicio*	Género (% muj.)	SNHL bil (%)	Seg** (%)
Almería (n=150)	56,6 ± 12,6	46,6 ± 12,6	61,3	42,7	51 (34)
Badajoz (n=104)	53,4 ± 13,6	46,3 ± 15,2	51,0	9,6	33(32)
Pontevedra (n=127)	54,4 ± 12,5	46,3 ± 12,4	71,7	30,7	40 (31)
Salamanca (n=99)	53,9 ± 12,5	45,9 ± 12,3	60,6	47,5	29 (29)
Santiago (n=155)	54,0 ± 13,8	45,5 ± 14,4	54,2	41,9	55 (35)
Valencia (n=55)	59,4 ± 13,5	44,1 ± 15,1	41,8	41,9	36 (65)
p valor	0,042	0,884	0,001	2,1 x 10⁻⁸	

Tabla 1: Variables clínicas de 690 pacientes con EM separados por su centro de origen. (n = número de pacientes con EM. *media ± desviación estándar; SNHL bil.: pérdida de audición neurisensorial bilateral; **Seg: seguimiento de los pacientes por 10 años).

En la *tabla 2* se muestra la comparación de las variables clínicas entre pacientes unilaterales y bilaterales. Sólo se seleccionaron pacientes que llevaban 5 años o más con la enfermedad para asegurar que no se incluyen en el grupo de unilaterales a pacientes que realmente se harán bilaterales con el transcurso de la enfermedad. Las variables edad de inicio de la enfermedad y porcentaje de mujeres no presentaron diferencias entre ambos grupos de unilaterales y bilaterales, así como las variables cefalea, migraña, historia de enfermedad reumática y consumo de tabaco que no fueron diferentes entre ambos grupos.

Variables	Bilateral (n=191)	Unilateral (n=275)	Valor de p
Edad de inicio; años (%)	45 (14)	44 (12)	0,64
Género; % mujeres	55	57,4	0,60
Oído afectado; %	40,3	izq. 32,0 der. 27,7	
Pérdida de audición en el diagnóstico; media dB (%)	59,3 (15,7)	49,9 (19,3)	2,9x10 ⁻⁶
Dolor de cabeza; n (%)	63 (38)	77 (31)	0,17
Migraña; n (%)	20 (10)	30 (11)	0,88
Historia reumatoide; n (%)	28 (15)	35 (13)	0,83
Consumo de tabaco; n (%)	37 (19)	62 (23)	0,11
Consumo de café; n (%)	39 (20)	54 (20)	0,92
Estadio de audición; 1-4 (%)	3,0 (0,7)	2,6 (0,8)	5,2x10 ⁻⁸
Estadio de audición; n (%)	Oído peor	Afectado	
1	3 (2)	25 (10)	
2	37 (22)	84 (34)	
3	85 (50)	106 (43)	
4	46 (27)	30 (12)	
Tiempo transcurrido; años±SD*	13 ± 8	11 ± 7	0,002
Clase; n (%)			
A	66 (35)	120 (44)	0,05
B o C	125 (65)	155 (56)	
Crisis de Tumarkin; n (%)	27 (25)	31 (19)	0,23
Escala funcional vértigo; n (%)			
1	32 (18)	47 (19)	0,004
2	44 (25)	81 (33)	
3	37 (21)	58 (23)	
4	27 (16)	42 (17)	
5	22 (13)	6 (2)	
6	4 (2)	3 (1)	

Tabla 2: Fenotipo entre los pacientes unilaterales y bilaterales de 466 pacientes con EM de más de cinco años de evolución. (dB: decibelios; *SD: desviación estándar) El estadio de audición, escala funciona del vértigo y la clase A, B o C fueron establecidos de acuerdo a la clasificación de la AAO-NHS (8)).

Las variables que presentaron diferencias entre sí fueron la hipoacusia en el momento del diagnóstico, que fue significativamente peor en los pacientes con SNHL bilateral (59,3 dB para bilaterales y 49,9 dB para unilaterales; $p=2,9 \times 10^{-6}$).

También, el estadio auditivo y las puntuaciones del nivel funcional del vértigo fueron significativamente peores en pacientes bilaterales ($p=5,2 \times 10^{-8}$ y $p=0,004$, respectivamente), cuando los parámetros fueron medidos en enfermos con al menos unos cinco años de seguimiento.

Al analizar el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad hasta el momento del estudio, el grupo de pacientes bilaterales tenían un tiempo de seguimiento de la enfermedad mayor, 13 años, frente a los unilaterales que mostraban unos 11 años de seguimiento ($p=0,002$). Este resultado evidencia que conforme avanza la enfermedad, un porcentaje de pacientes unilaterales se convierten en bilaterales.

Al realizar las curvas de supervivencia para analizar la persistencia de los episodios de vértigo según el tiempo de evolución de la enfermedad en 673 pacientes (444 unilaterales y 229 bilaterales), la duración media del vértigo recurrente fue de unos 10 años en pacientes con EM unilateral (95% de intervalo de confianza, IC, 8,56-11,44), mientras que la duración media del vértigo recurrente en pacientes con EM bilateral fue significativamente más larga, de unos 12 años (95% de intervalo de confianza, IC, 10,4-13,6) (test log-rank, $p=0,029$, *fig. 1.A*).

Con respecto a la audición, el tiempo transcurrido para alcanzar cada estadio de audición fue examinado en 611 pacientes (403 unilaterales y 208 bilaterales). La media de los años necesarios para alcanzar el estadio 4 (>75dB) fue de 27 y 24 en pacientes con uno o ambos oídos afectados, respectivamente (test log-rank, $p=0,36$; *fig. 1.B*), por lo que no hay diferencias significativas a la hora de alcanzar el estadio 4 entre los dos tipos de pacientes.

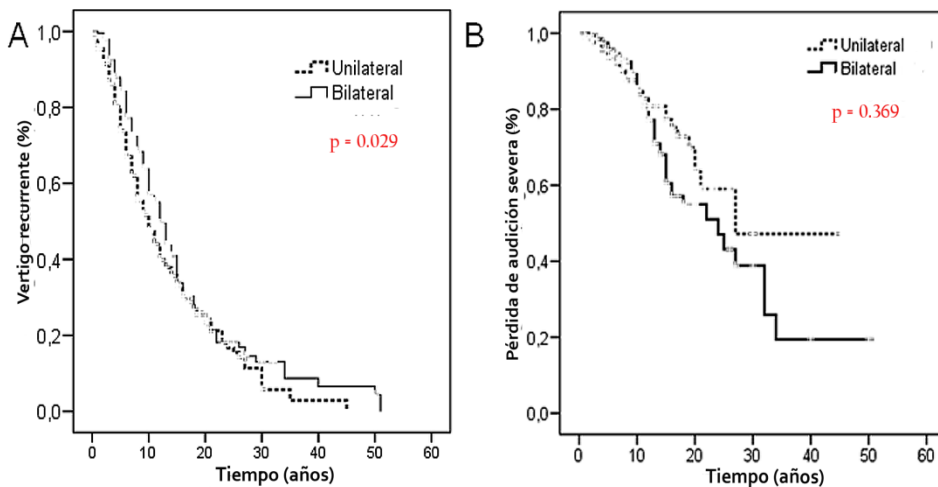


Fig. 1: Curvas de supervivencia que analizan la persistencia del vértigo y la evolución de la pérdida de audición en los pacientes. 1.A) Curva de supervivencia para la persistencia del vértigo respecto al tiempo transcurrido de la EM. En los pacientes bilaterales se observa una duración más prolongada de los episodios de vértigo. 1.B) Curva de supervivencia para el tiempo necesario para alcanzar el estadio 4 de pérdida de audición. No existen diferencias entre los pacientes unilaterales y bilaterales con EM para esta variable.

La prevalencia de las EAs fue estimada en 575 pacientes de nuestra cohorte (*tabla 3*). Ocho de nuestros pacientes con EM tuvieron AR, cinco fueron diagnosticados de LES y cuatro sujetos padecían espondilitis anquilosante.

Enfermedad autoinmune	Unilateral (N=378)	Bilateral (N=197)	TOTAL	Prevalencia (%)
Artritis reumatoide	5	3	8	1,39
Artritis psoriásica	1	0	1	0,17
Oligoartritis	1	0	1	0,17
Espondilitis anquilosante	0	4	4	0,70
Enfermedad de Paget	1	0	1	0,17
Polimialgia reumática	1	1	2	0,35
LES	4	1	5	0,87
Síndrome de Sjogren	2	1	3	0,52
Hipotiroidismo autoinmune	7	0	7	1,22
Enfermedad de Graves	2	2	4	0,70
Tiroiditis autoinmune	2	2	4	0,70
Diabetes tipo I	1	1	2	0,35
Trombocitopenia autoinmune	1	0	1	0,17
Cirrosis hepática primaria	1	0	1	0,17
Hepatitis autoinmune	0	1	1	0,17
Colitis ulcerosa	2	1	3	0,52
Fiebre reumática	2	0	2	0,35
Neumonitis	1	0	1	0,17
Sarcoidosis	0	1	1	0,17
Psoriasis	1	3	4	0,70
Indeterminado	4	5	9	1,57
N	39	24	63	
Prevalencia total	10,29	12,18	10,95	

Tabla 3: Prevalencia de distintas EA diagnosticadas en 575 pacientes con EM.

La prevalencia estimada de las EAs en nuestra serie de pacientes con EM fue de 1,39 para AR; 0,87 para LES; y 0,70 para la espondilitis anquilosante. Estas prevalencias fueron superiores a las existentes en la población caucásica europea. El resto de enfermedades que estudiamos no presentaron diferencias con respecto a la población caucásica de referencia.

El total de la prevalencia estimada no difiere entre pacientes con hipoacusia neurosensorial unilateral o bilateral ($p=0,17$). Sin embargo, las EAs fueron más comúnmente observadas entre pacientes con migraña que en sujetos con cefalea tipo tensional ($p=0,007$). En nuestra cohorte había 72 pacientes con migraña y EM, y 19 de ellos (26%) tuvieron un diagnóstico de EA. Sin embargo, sólo el 10% de los pacientes con cefalea tipo tensional padecían alguna EA.

Se diseñaron modelos de regresión lineal múltiple para el estudio del estadio de pérdida de audición y la frecuencia de los episodios de vértigo, como variables dependientes, para determinar qué factores clínicos o analíticos podrían explicar la predicción de su variabilidad. Los resultados de estos análisis aparecen en la *tabla 4*.

El estadio auditivo dependía de la bilateralidad, del estado de la audición en el momento del diagnóstico y de los linfocitos B CD19⁺ ($R^2=0.52$; $p=0.01$).

Además, los pacientes que padecieron una crisis de vértigo en los últimos seis meses mostraron una asociación significativa con el valor en la escala funcional, el aumento de los linfocitos B CD8⁺ y el componente c4 del sistema del complemento ($R^2=0.12$; $p=0.05$).

Síntomas	Factor	R ²	R ² co.	β	p valor
<i>Pérdida de audición</i> N=186	<i>Constante</i>	0,52	0,51	0,41	0,021
	1 Pérdida de audición bilateral			0,47	8,6x10 ⁻⁶
	2 Pérdida de audición en el diagnóstico			0,03	1,5x10 ⁻¹⁸
	3 Incremento de células CD19			0,36	0,010
<i>Vértigo</i> N=365	<i>Constante</i>	0,12	0,11	0,30	2,9x10 ⁻⁸
	1 Nivel funcional			0,11	5,1x10 ⁻¹⁰
	2 Incremento de células CD8			0,20	0,015
	3 Incremento C4			0,30	0,054

Tabla 4: Valores del análisis de regresión múltiple. Se estudiaron las variables clínicas e inmunológicas asociadas con pérdida de audición y frecuencia del vértigo en EM. La tabla muestra las variables relacionadas o responsables de la varianza en la pérdida de audición o en el vértigo recurrente de los pacientes. (R^2 : coeficiente de determinación. R^2 co: coeficiente de determinación corregido. β : coeficiente de regresión no estandarizado).

Finalmente, nos dispusimos a estudiar el perfil inmunológico de nuestros pacientes, comparando estos parámetros entre unilaterales y bilaterales, para ver si éstos presentaban valores normales.

Al analizar el perfil inmunológico en los pacientes con EM no se observaron diferencias algunas para los ANA, c3, c4, CIC, IgG, IgM, IgA o para la población linfocitaria u otros parámetros entre pacientes con

EM e hipoacusia uni o bilateral como observamos en la siguiente tabla (tabla 5).

	Total	Bilaterales	Unilaterales	P
ANA IFI 1/160 (%)	30/400 (7)	12/153 (8)	18/247 (7)	0,86
ANA ELISA (%)	7/71 (10)	3/33 (9)	4/38 (10)	1,00
ENA (%)	14/315 (4)	8/135 (6)	6/180 (3)	0,28
Anti dsDNA	4/116 (3)	2/46 (4)	2/70 (3)	0,65
C3 (%)	42/437 (10)	20/171 (12)	22/266 (8)	0,49
C4 (%)	55/437 (13)	26/170 (15)	29/267 (11)	0,22
CIC (%)	36/422 (8)	17/164 (10)	19/258 (7)	0,28
IgM (%)	28/333 (8)	8/127 (6)	20/206 (10)	0,32
IgG (%)	8/333 (2)	1/128 (1)	7/205 (3)	0,16
IgA (%)	21/315 (7)	7/123 (6)	14/192 (7)	0,84
Células CD4				
Baja	17/386 (4)	6/158 (4)	11/228 (5)	0,35
Incremento	19/386 (5)	5/158 (3)	14/228 (6)	
Células CD8				
Baja	10/391 (3)	7/160 (4)	3/231 (1)	0,15
Incremento	25/391 (7)	9/160 (6)	16/231 (7)	
Incremento células CD16	22/192 (11)	9/89 (10)	13/103 (13)	0,35
Incremento células CD19	21/190 (11)	7/86 (8)	14/104 (13)	0,40
Incremento células CD3	27/361 (7)	7/144 (5)	20/217 (9)	0,27

Tabla 5: Comparación de las variables inmunológicas entre pacientes con EM unilateral y bilateral. Ninguno de los parámetros presentó diferencias entre pacientes unilaterales y bilaterales, y tampoco con los controles.

Los niveles de suero de TNF α e INF γ fueron medidos en 73 de nuestros pacientes españoles y los resultados no mostraron diferencias entre los controles y los pacientes uni o bilaterales (tabla 6).

Se observó una mayor concentración de ambas citoquinas en los pacientes bilaterales, aunque este aumento no reflejaba diferencias significativas.

Citoquina	Bilateral (n=29)	Unilateral (n=44)	Controles (n=99)	P
TNF α	16,6 \pm 21,6	11,7 \pm 19,8	11,1 \pm 15,0	0,32
INF γ	5,0 \pm 6,5	3,7 \pm 3,2	3,5 \pm 3,5	0,25

Tabla 6: Niveles de TNF α e INF γ en suero. Estudio comparativo de las concentraciones en suero (pg/ml) de TNF α e INF γ . Entre pacientes bilaterales y unilaterales, así como a una población control (media \pm desviación estándar).

4. DISCUSION.

En este capítulo estimamos el coeficiente de agregación familiar de la EM.

La frecuencia de hermanos enfermos en nuestra serie fue de un 4,3%. La frecuencia de familiares (cualquier grado) enfermos en nuestra serie de pacientes fue de 9,1%. Este último dato es confirmado por otros estudios en los que entre el 5%-13% de los enfermos presentan una historia familiar de la enfermedad (14).

El coeficiente de agregación familiar λ_s encontrado en nuestros pacientes fue de 57. Para confirmar nuestros resultados repetimos el cálculo de la agregación usando una prevalencia de la población general más alta. Con esta condición más estricta se obtienen valores más bajos de agregación familiar pero el objetivo fue determinar sin lugar a dudas que entre los enfermos de Meniere existía agregación familiar ($\lambda_s > 1.0$). Aun usando el dato de prevalencia más alta el resultado fue de 29, confirmando la existencia de una agregación familiar muy significativa.

En otras EAs como LES, el coeficiente es $\lambda_s=22$ [\(15\)](#). Aunque otros trabajos han encontrado valores entre 5,8 y 58 [\(16\)](#). En la AR varía de 3-15 y en la DT1 es de 16 [\(4\)](#).

No existe ningún estudio publicado anteriormente que haya analizado el λ_s en la EM. Nosotros demostramos una fuerte agregación dentro de las familias de enfermos con EM.

Hay que puntualizar que este coeficiente indica sólo agregación familiar, y que familiar no significa necesariamente genética o hereditaria y, por tanto, puede ser debida a factores genéticos o a factores ambientales (o a una combinación de ambos), pero resulta imprescindible conocer la historia familiar de las enfermedades porque a menudo son el único indicador disponible de una posible etiología hereditaria de las enfermedades complejas antes de encontrar los genes de susceptibilidad [\(17\)](#). La realización de estas estimaciones es, por tanto, el primer paso antes de empezar un estudio de asociación genética.

Para conocer el efecto genético real dentro de una enfermedad habría que buscar estrategias para disociarlo del efecto medioambiental. Para ello es necesario recurrir a estudios con gemelos monocigóticos (que comparten el 100% de su ADN) y observar la concordancia entre los hermanos (que comparten sólo un 50% de los alelos) o recurrir a familias de hermanos adoptados para anular el efecto del ambiente [\(18\)](#).

Serán necesarios más estudios que analicen estos valores en la EM. Para esto destacamos la importancia de recoger la historia familiar de los enfermos con EM en las historias clínicas de los pacientes y especialmente la identificación de pacientes con EM que tengan gemelos monocigóticos. Sólo de esta forma será posible establecer una estimación fiable.

La edad media de los pacientes con EM reclutados para nuestro trabajo se encuentra entre 53-59 años de edad y en relación al sexo, a excepción de algunos centros, nuestros pacientes presentaron una ligera predominancia de mujeres. Estos datos se encuentran en concordancia con los obtenidos por otros autores en otros trabajos anteriores [\(19\)](#).

En nuestra muestra analizamos las diferencias entre pacientes unilaterales y bilaterales y no aparecieron diferencias entre la edad de inicio de la enfermedad entre ambos pacientes. Esto tampoco ocurrió ni para la distribución de género, ni para las variables dolor de cabeza, historia reumática, consumo de tabaco o migraña. Los pacientes con migraña se presentaron en la misma frecuencia que la población general, concordando con un reciente estudio [\(20\)](#). Nuestros datos no apoyan la creencia de que la migraña es más frecuente en pacientes con EMB.

Las siguientes variables clínicas sí presentaron diferencias entre unilaterales y bilaterales: la pérdida de audición en el momento del diagnóstico, estadio auditivo, nivel funcional de vértigo, clasificación de

los pacientes, tiempo transcurrido desde el diagnóstico y persistencia de los episodios de vértigo.

La pérdida de audición en el momento del diagnóstico fue peor en los pacientes bilaterales y esto podría ser explicado por un retraso en el diagnóstico de esos casos bilaterales o por un inicio de la pérdida de audición que se produzca de manera más brusca en esos pacientes.

Ya se ha demostrado en otros trabajos que el perfil de hipoacusia neurosensorial es diferente en pacientes con una pérdida de audición unilateral o bilateral, y cuando los niveles de audición son corregidos por la edad, los pacientes con EMB presentan una hipoacusia pantonal precoz, mientras que los enfermos con EMU suelen presentar una hipoacusia de baja frecuencia [\(21\)](#). El estadio de la audición es, por tanto, peor para los pacientes bilaterales cuando se compara su oído más afectado con el oído afectado de los unilaterales.

Se sabe que la hipoacusia fluctúa en los primeros años del transcurso de la enfermedad [\(13, 22, 23\)](#) y que algunos pacientes, con el tiempo, pueden desarrollar la enfermedad también en el segundo oído.

Por esta razón comparamos la pérdida de audición en pacientes que llevaban al menos 15 años de evolución de la enfermedad. En este subgrupo, los años de evolución fueron de unos 21 y 22 años para unilaterales y bilaterales respectivamente, pero no se encontraron diferencias en los niveles de audición, sugiriendo que después de 20

años de enfermedad, el comportamiento de la SNHL parece ser el mismo en todos los pacientes.

En relación al vértigo, trabajos anteriores han mostrado que el número de episodios de vértigo es mayor en los primeros años de la enfermedad [\(13, 23, 24\)](#), y el número de pacientes sin episodios de vértigo incrementa con el tiempo [\(24\)](#), mostrando así dos fases en la evolución natural de la EM. Sin embargo, esos estudios no incluyeron un número suficiente de pacientes con hipoacusia neurosensorial bilateral para investigar las diferencias clínicas entre ambos grupos, unilaterales y bilaterales, por lo que podría estar cometándose un error al no estar ambos grupos apareados para el tamaño muestral.

Nuestro estudio fue realizado con un porcentaje de enfermos unilaterales y bilaterales similar y aparecieron diferencias entre el número de años con episodios de vértigo entre los pacientes uni y bilaterales. Los ataques de vértigo duraban al menos dos años más en los pacientes bilaterales, sugiriendo que ambos oídos podrían estar envueltos en la ocurrencia de los episodios de vértigo. Esto fue demostrado mediante los análisis Kaplan-Meier donde se reflejó que el tiempo de evolución de los episodios de vértigo es diferente en pacientes con hipoacusia unilateral o bilateral, sugiriendo que la condición causante de los episodios debe persistir durante un largo periodo de tiempo en casos con hipoacusia bilateral.

Esto también puede estar viéndose afectado por el hecho de que los pacientes bilaterales presentan un tiempo transcurrido desde el inicio de su enfermedad mayor que los unilaterales ($p=0,002$).

Al realizar los análisis de regresión múltiple para las variables clínicas e inmunológicas asociadas con la pérdida de audición y el vértigo recurrente descubrimos lo siguiente:

El estadio auditivo dependía de la bilateralidad, del estado de la audición en el momento del diagnóstico y de un incremento de los CD19. El coeficiente de determinación (R^2) de esta regresión fue de 0,52 lo que refleja que un 52% de la varianza en los estadios de audición de los pacientes es explicada por estas variables.

Por tanto, los pacientes tenían un estadio auditivo más avanzado si habían pasado a ser bilaterales; así como si el diagnóstico se producía de manera tardía puesto que cuanto peor se encontraban los pacientes en el momento del diagnóstico, eran más irrecuperables y presentarían un peor estado auditivo con el tiempo.

En tercer lugar, un incremento de los linfocitos B (CD19) también se asoció con una peor audición en nuestros pacientes. El CD19 es un Ag presente en la superficie celular de las células B que forma complejo con CD21 y CD81. Este Ag es un co-receptor que facilita la activación de los linfocitos B y que es importante para que se produzca la activación y la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas. El CD19 ha sido

implicado en las EAs y puede ser útil como diana terapéutica para este tipo de enfermedades [\(25\)](#) y por tanto, para la EM.

Por otro lado, el vértigo recurrente fue relacionado con la escala funcional, con un elevado nivel de los linfocitos T CD8⁺ y el aumento del componente c4 del sistema del complemento. En este caso la R² fue de 0.12, por lo que este modelo sólo explicaría el 12% de la varianza del vértigo.

Los linfocitos T CD4⁺ predominan en el saco endolinfático, mientras que los CD8⁺ son escasos, pero la relación entre CD4⁺/CD8⁺ puede estar invertida en los casos de estimulación antigénica crónica, como en la presencia de neuroma acústico [\(26\)](#). Este equilibrio CD4⁺/CD8⁺ también sufre un desajuste en la ALSNHL (hipoacusia neurosensorial de tono bajo). Estos resultados sugieren la posibilidad de que la etiología de ALSNHL y EM podrían compartir una alteración de la respuesta inmune [\(27\)](#).

Una de las limitaciones de este estudio es que todos los análisis del patrón inmunológico fueron realizados en la fase quiescente de la enfermedad, durante una visita de rutina del paciente a la consulta, donde el paciente se encuentra asintomático o después de que se le haya suministrado el tratamiento, por lo que la activación de los procesos inmunológicos puede verse disminuido o modificado con la evolución de la enfermedad cuando ésta va de un periodo crítico a uno inter-crítico

y sería necesario realizar las determinaciones cuando los pacientes presentan una de las crisis de la enfermedad.

Nosotros hemos encontrado un incremento de EAs sistémicas (AR, LES y espondilitis anquilosante) en pacientes con EM en nuestra cohorte. La coexistencia de EAs o inflamatorias dentro de la misma familia o incluso en el mismo individuo, propone una coexistencia de mecanismos fisiopatológicos similares en las distintas enfermedades. Y ello podría deberse a factores genéticos comunes implicados en la susceptibilidad a dicho grupo de enfermedades [\(28\)](#).

Para la AR y la espondilitis, la prevalencia estimada en los pacientes con EM fue unas 2-3 veces más elevada [\(29\)](#), pero para el LES la prevalencia se vio aumentada unas 8 veces [\(16\)](#).

Un estudio reciente describió una alta frecuencia de SNHL y hallazgos anormales en los test vestibulares en una serie de pacientes con espondilitis, pero estos pacientes no cumplían los criterios diagnósticos de la EM, pues no presentaban episodios de vértigo [\(30\)](#).

Otras investigaciones han encontrado relación entre el sistema auditivo y LES, llegando a proponer a éste como un elemento en la clínica del LES. Así, demostraron que los pacientes con LES tenían un umbral auditivo peor para todas las frecuencias que el grupo control, y el 28% de estos pacientes acabaron desarrollando SNHL [\(31\)](#).

Otro trabajo, aunque realizado con un número de muestra pequeño, investigó la hipoacusia y la función coclear en pacientes con LES, encontrando una pérdida de audición a baja frecuencia en estos pacientes [\(32\)](#). Aunque, al igual que ocurría en el trabajo de la espondilitis, estos pacientes no cumplen totalmente los criterios diagnósticos de la EM, presentan afectación coclear en un pequeño porcentaje de casos.

Además, las EAs sistémicas fueron más comúnmente observadas en pacientes con EM y migraña que en casos con EM y cefalea tensional. Estos hallazgos sugieren que las EAs deberían ser consideradas en todos los casos, pero especialmente en pacientes con EM y migraña.

Aunque esto no ha sido documentado anteriormente en los pacientes con EM, sigue siendo necesario aumentar el número de estudios para poder confirmar el espectro de EM-EA-migraña.

La asociación entre migraña y LES no está claramente establecida. Aunque algunas investigaciones han descrito una asociación entre LES y la presencia de cefaleas, apareciendo éstas en el 30-65% de los pacientes [\(33\)](#), otros estudios no confirmaron estos hallazgos. Así, un meta-análisis del año 2004 no encontró diferencias en la prevalencia de la migraña entre los pacientes con LES y controles, aunque la migraña con aura podía ser más frecuente entre los pacientes con LES [\(34\)](#).

Otros estudios multicéntricos deberán confirmar esta prevalencia mayor de las EAs en los enfermos con EM.

ANEXO 1.



Empresa Pública Hospital de Poniente
CONSEJERÍA DE SALUD

NºHistoria

Nº Solicitud

CONSENTIMIENTO INFORMADO EXTRACCION SANGRE

Yo.....
 (paciente/padre o madre del paciente/custodio legal del paciente) (nombre y apellidos)
 declaro que he sido informado de que
(nombre de la
 persona a la que se le hace la extracción), presenta una enfermedad de Meniere, y podría estar
 afectado o ser portador de un trastorno genético y que el diagnóstico se basa en los resultados
 de investigaciones de laboratorio llevadas a cabo en muestras biológicas (sangre y/o tejidos y/u
 otros líquidos biológicos) del paciente. Estas muestras no se utilizarán con ningun otro fin que
 el descrito en el proyecto ISCIII 2010/0920, aprobado por el Comité de Etica e Investigación
 Sanitaria con fecha 6 de Abril de 2010.

Doy consentimiento para el uso de una muestra de sangre en la Empresa Pública Hospital de
 Poniente y otros laboratorios designados por el mismo del Sistema Nacional de Salud para
 ayudar en el proceso de diagnóstico y otros estudios científicos dirigidos a la mejora del
 conocimiento de esta enfermedad, siempre de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica
 vigente.

SI NO
 (Marcar con una "X" la opción deseada)

Firma del paciente/padre o madre del paciente/custodio legal del paciente

Fecha:.....

Firma del Médico Responsable del paciente: Dr.....

Fecha:.....

5. BIBLIOGRAFIA.

1. Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport (2012). Autoimmunity and transplantation. En: Murphy, Kenneth P. (eds.). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. p.626-637.
2. Delgado-Vega A, Sánchez E, Löfgren S *et al*. Recent findings on genetics of systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2010;22(6):698-705.
3. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996;85(3):311-8.
4. Neil Risch. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 1990;46:222-8.
5. Tolerancia y mecanismos de autoinmunidad (2011). En: Peakman, Mark; Vergani, Diego (eds.). *Inmunología Básica y Clínica, Barcelona, Elsevier España SL, p.121-132*.
6. Riente L, Bongiorno F, Nacci A *et al*. Antibodies to inner ear antigens in Meniere's disease. *Clin Exp Immunol* 2004;135:159-63.
7. Nacci A, Dallan I, Monzani F *et al*. Elevated antithyroid peroxidase and antinuclear autoantibody titers in Meniere's disease patients: more than a chance association? *Audiol Neurotol* 2010;15:1-6.
8. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181-185.
9. WMA. Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *World Medical Association, Inc* 2008;59th meeting, Seoul.
10. España. Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación biomédica. *Boletín Oficial del Estado*, 4 de julio de 2007, num 159, p.28826-48.

11. Guo SW. Inflation of sibling recurrence-risk ratio, due to ascertainment bias and/or overreporting. *Am J Hum Genet* 1998;63:252-8.
12. Morales AC, Gómez-Castellanos R, García-Mantilla J et al. Epidemiología de la enfermedad de Ménière en Cantabria. *Acta Otorrinlaringol Esp* 2003;54:601-5.
13. Wladislavosky-Waserman P, Facer GW, Mokri B et al. Ménière's disease: a 30-year epidemiologic and clinical study in Rochester, MN, 1951-1980. *Laryngoscope* 1984;94:1098-102.
14. Klar J, Frykholm C, Friberg U et al. Meniere's disease gene linked to chromosome 12p12.3. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B(5):463-7.
15. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol* 2003;24(11):595-602.
16. Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, Cardiel MH et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases in 1177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum* 2005;52:1138-47.
17. Hemminki K, Li X, Sundquist J et al. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 2009;60(3):661-8.
18. Oliva R, Ballesta F (2204). Aspectos de la expresión fenotípica y patrones no clásicos de herencia monogénica. En: Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Claria J. *Genética médica*, España, Publicacions i Edicions, p. 85-93.
19. Alexander TH, Harris JP. Current epidemiology of Meniere's syndrome. *Otolaryngol Clin North Am* 2010;43(5):965-70.
20. Gopen Q, Virre E, Anderson J. Epidemiologic study to explore links between Meniere syndrome and migraine headache. *Ear Nose Throat J* 2009;88:1200-4.

21. Belinchon A, Perez-Garrigues H, Tenias JM *et al.* Hearing assesement in Meniere's disease. *Laryngoscope* 2011 121: 622-6.
22. Stahle J, Friberg U, Svedberg A. Long-Term progression of Meniere's disease. *Am J Otol* 1989 10:170-3.
23. Green JD, Blum DJ, Harner SG. Longitudinal follow-up of patients with Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;104:783-8.
24. Perez-Garrigues H, Lopez-Escamez JA, Perez P *et al.* Time course of episodes of definitive vertigo in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:1149-54.
25. Fujimoto M, Sato S. B cell signaling and autoinmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity. *J. Dermatol Sci* 2007;46(1):1-9.
26. Dong C, Flavell RA. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 2001;8:47-51.
27. Fuse T, Hayashi T, Oota N *et al.* Immunological responses in acute low-tone sensorineural hearing loss and Meniere's disease. *Acta Otolaryngol* 2003;123(1):26-31.
28. Diaz-Gallo L, Martin J. Common genes in autoinmune diseases: a link between immune-mediated diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2012;8(2):107-109.
29. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11:229.
30. Amor-Dorado JC, Barreira-Fernandez MP, Vazquez-Rodriguez TR *et al.* Audiovestibular manifestations in patients with ankylosing spondilitis. *Medicine* 2011;90:99-109.
31. Maciaszczyk K, Durko T, Waszczykowska E *et al.* Auditory function in patients with systemic lupus erythematosus. *Auris Nasus Larynx* 2011;38(1):26-32.

32. Karabulut H, Dacli M, Ates A et al. Results for audiology and distortion product and transient evoked otoacoustic emissions in patients with systemic lupus erythematosus. *J Laryngol Otol* 2010;124(2):137-40.
33. Glanz BI, Venkatesan A, Schur PH et al. Prevalence of migraine in patients with systemic lupus erythematosus. *Headache* 2001;41(3):285-9.
34. Mitsikostas DD, Sfikakis PP, Goadsby PJ. A meta-analysis for headache in systemic lupus erythematosus: the evidence and the myth. *Brain* 2004;127:1200-9.

Capítulo III: Estudio de genes relacionados con autoinmunidad en la enfermedad de Meniere

1. INTRODUCCIÓN.

De acuerdo con la AARDA (*American Autoimmune Related Diseases Association*), el grupo de las Enfermedades Autoinmunes (EAs) hace referencia a un conjunto de 80 enfermedades crónicas donde un proceso inflamatorio crónico de origen desconocido y mediado por el sistema inmune provoca daño tisular. Los mecanismos que desencadenan las respuestas inmunes hacia los componentes propios del organismo y controlan la progresión de las enfermedades autoinmunes no han sido todavía dilucidados [\(1\)](#).

La hipótesis de que el oído es un órgano diana para una reacción autoinmune se plantea por primera en el año 1961, cuando se describió que a cobayas se les provocaba una respuesta inflamatoria en el oído interno mediante la inyección local de un suero heterólogo frente a tejido coclear [\(2\)](#).

Otros estudios pusieron de manifiesto la importancia de los procesos autoinmunes en el desarrollo de afecciones del oído interno [\(3, 4\)](#). El órgano dentro del oído interno involucrado en la respuesta

inmunológica es el saco endolinfático, que contiene células inmunocompetentes, linfocitos y macrófagos (5). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que el epitelio del saco endolinfático es parecido a un mesotelio, que tiene capacidad secretora y de reabsorción, y la existencia de células T colaboradoras CD4+, CD8+, macrófagos y células B portadoras de IgM, IgG e IgA (6). El saco endolinfático puede estar involucrado en diversas disfunciones cocleo-vestibulares, como en la EM de etiología inmunomediada. La reacción inmunológica ha sido comprobada en el saco endolinfático de los enfermos de Meniere, demostrándose su posible etiología inmunomediada (7), que podría seguir el siguiente mecanismo (fig. 1) (8).

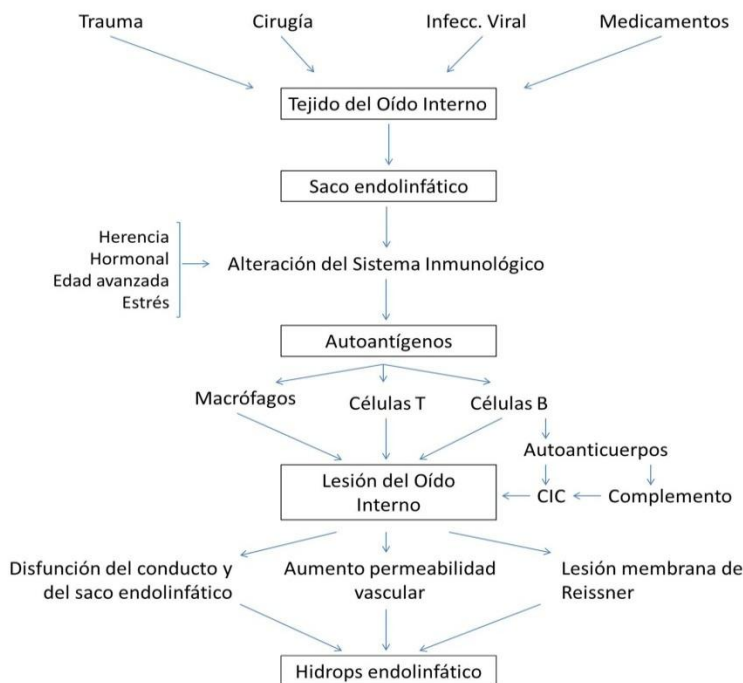


Fig. 1: Esquema sugerido por Ramirez-Camacho (8) como mecanismo autoinmune en la EM.

Una dificultad importante para definir los mecanismos de muchas EAs ha sido la incapacidad para identificar los Ags que desencadenan la respuesta y los linfocitos que median en estas reacciones.

El proceso autoinmune puede ser el resultado de alteraciones en la regulación de las células B, T o de ambas, aunque también se ha sugerido otro mecanismo importante en relación a la tolerancia periférica que podría ser la continua presentación de autoantígenos por células que no son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales. En tercer lugar, se podrían producir alteraciones de la vía CD40/CD40L que pueden influir en la susceptibilidad a la apoptosis de las células B. En cuarto lugar, estaría la distinta funcionalidad de las citoquinas Th1/Th2 que tienen un papel importante en el desarrollo de varias EAs.

En la *figura 2* se muestra un posible mecanismo a nivel celular de lo que podría ocurrir en la EM, donde intervienen elementos tanto de la Respuesta Inmune Innata (RII) como de la Respuesta Inmune Adaptativa (RIA).

La idea de que la respuesta autoinmune puede ser desencadenada por infecciones está muy extendida [\(9\)](#). De igual forma, la cirugía, los traumatismos o los medicamentos, entre otros, pueden ser también los desencadenantes de una EA.

Estos procesos de estrés desencadenados en la célula diana provocarían la expresión de unas proteínas de membrana, denominadas MICA, en la

superficie de estas células alteradas, que son reconocidas por las células NK y $\gamma\delta$ T y linfocitos T CD8⁺.

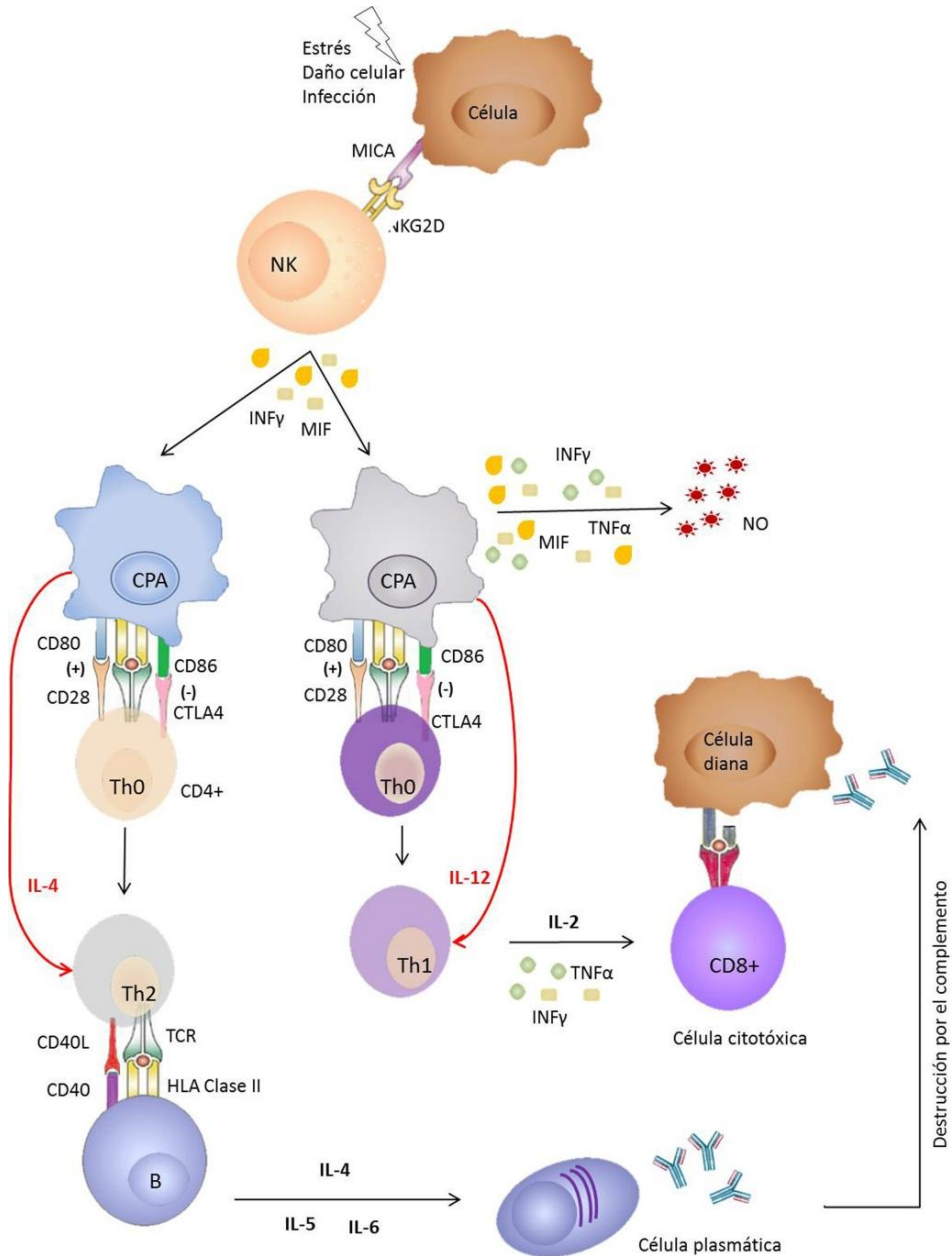


Fig. 2: Posible mecanismo autoinmune en la EM: Las células Natural Killer (NK) reconocen a sus ligandos MICA expresados en la superficie

de las células tras haber sufrido un proceso de estrés. Esta unión inicia la RI promoviendo la activación de las CPAs. Se activaría a la vez un proceso inflamatorio. Las CPAs presentan los péptidos degradados mediante sus proteínas de membrana (HLA). Los complejos de HLA y péptidos antigénicos, expuestos sobre las CPAs, son reconocidos por las células T provocando su activación y diferenciación selectiva. Se diferenciarían aquí por dos vías diferentes: una primera vía (izda.) donde por la acción la IL-4 se induce la diferenciación de los linfocitos CD4+ Th0 a Th2 que son capaces de colaborar con los linfocitos B e inducir su transformación en células plasmáticas productoras de anticuerpos frente a antígenos del oído interno. La segunda vía (dcha.) esta mediada por la IL-12 que interviene en la diferenciación de los linfocitos Th1 que estimularían a los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Las células T CD8+ citotóxicas son capaces de reconocer las células afectadas y promover su lisis o apoptosis [\(10\)](#). En ambas vías de diferenciación de los linfocitos TH0 interviene como molécula reguladora el CTLA4 que una vez activada la célula interfiere con CD28 para la unión con CD80/86 provocando una señal inhibidora como mecanismo de control de la activación linfocitaria.

Aquí, la RII se vería iniciada y estaría destinada, inicialmente, a conferir protección para intentar reducir este problema. En la respuesta inmune innata participan algunas poblaciones celulares (células NK, células TNK y células $\gamma\delta$ T) y algunos componentes solubles (TNF, IL-1, IL-12 e IL-18) [\(11\)](#). Las células NK, que interactúan mediante los receptores NKG2D uniéndose a las moléculas MICA de la célula diana, pueden contribuir al desarrollo de EAs lisando a las células diana o interactuando directamente con las células presentadoras de antígenos (CPAs) [\(12\)](#).

Después de esto, un amplio rango de citoquinas (IFN α , β , IL-1, TNF α , IL-12, IL-18) son producidas por estas CPAs (macrófagos o células dendríticas) que provocarían el aumento de la permeabilidad vascular y

el reclutamiento de las células T, células B, más macrófagos y células dendríticas al lugar de la lesión [\(13, 14, 15\)](#). La IL-12, concretamente, tiene la capacidad de dirigir la diferenciación y expansión de las células Th1 y establecer una comunicación entre los componentes celulares de la inmunidad innata y adaptativa iniciándose la respuesta inmune adaptativa.

Cabe destacar el importante papel que desempeñan también las quimioquinas en el reclutamiento celular y regulación autocrina de las propias células dendríticas.

La Respuesta Inmune Adaptativa o específica, viene provocada principalmente por la activación de las CPAs, que presentan los Ags propios procedentes de la célula diana. Esta presentación de Ags se realiza a través de las moléculas HLA de Clase II y va dirigida a los linfocitos Th0.

Esto provoca la activación de los linfocitos Th1 y Th2, desencadenando el reclutamiento de los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y los linfocitos B. Las células diana del oído interno también pueden ver afectada su función por la acción de los Acs específicos generados por las células B, o bien por la activación del complemento. A su vez, el aumento de la expresión de moléculas HLA clase I en las células diana del oído interno las convertiría en vulnerables frente a la acción de los linfocitos T CD8⁺.

Este capítulo tiene el objetivo de estudiar diferentes polimorfismos de diferentes genes implicados en la RII y la RIA y que han sido asociados a otras EAs en trabajos anteriores, y analizar su asociación con la EM.

1.1. RESPUESTA INMUNE INNATA (RII)

1.1.1- GENES IMPLICADOS EN LA RII.

Gen relacionado a cadenas MHC de Clase I (MICA)

Una de las poblaciones celulares que se encuentra elevada en los procesos autoinmunes son las poblaciones linfocitarias que sobre-expresan en su superficie receptores NKG2D, entre ellas las células NK. Estos receptores NKG2D reconocen a las moléculas MICA [\(16\)](#) (fig. 3), entre otras, que son inducidas en la superficie de las células cuando éstas sufren procesos de estrés, procesos inflamatorios, aloinjertos, infecciones o transformación tumoral [\(17\)](#).

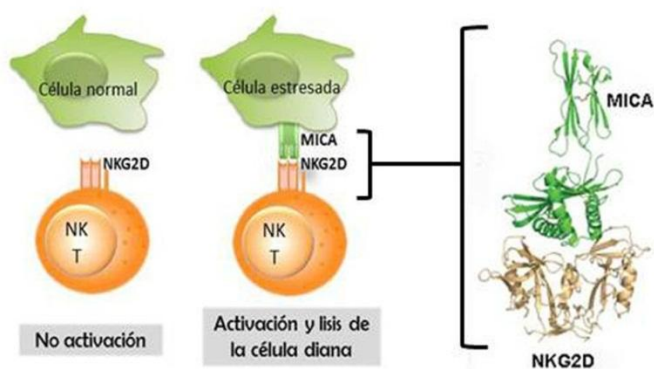


Fig. 3: Unión de MICA por el receptor NKG2D de las células NK. Una célula normal no activa la lisis celular. Sin embargo, en una célula estresada se induce la expresión de MICA. La unión MICA-NKG2D activa la lisis de la célula diana. Podemos ver en detalle la unión de ambas proteínas en la imagen de la dcha. [\(18\)](#).

La activación del receptor NKG2D puede inducir la lisis de la célula diana y desencadenar la producción de citoquinas inflamatorias [\(19\)](#).

Las células NK juegan, por tanto, un papel activo en la patogenia de las EAs propiciando el inicio y la progresión de la autoinmunidad [\(20\)](#), principalmente porque provocan un ambiente inflamatorio secretando $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2 e IL-4, que provocan daños en los tejidos.

La interacción entre NKG2D-MICA desencadena respuestas autoinmunes que han sido demostradas anteriormente en EAs como la AR, EC, DT1, en las cuales esta unión puede ser aberrantemente inducida [\(16\)](#).

El gen MICA (MIM*600169), localizado en el cromosoma 6 tiene 6 exones separados por cinco intrones, siendo el primer intrón el más largo. El gen MICA es transcrito a una proteína de 383 aminoácidos, aunque este tamaño varía si nos basamos en el número de Alaninas variables que aparecen en el segmento transmembrana [\(21\)](#). La proteína está compuesta por tres dominios extracelulares ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) codificados por el exón 2, exón 3 y exón 4, respectivamente, y un dominio transmembrana codificado por el exón 5 (*fig. 4*).

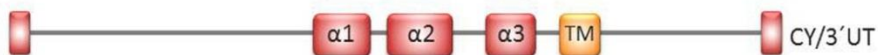


Fig. 4: Organización del gen MICA. Las cajas $\alpha 1$ - $\alpha 3$ equivalen a los dominios externos de la proteína; TM equivale al segmento transmembrana; CY a la cola citoplasmática; y 3'UT a la secuencia 3'.

La región transmembrana de la proteína está codificada por el exón 5 del gen y este exón porta un STR compuesto por la repetición de tripletes GCT en la posición 293 [\(23\)](#) que dará lugar a un número variable de Alaninas en la proteína (*fig. 5*).



Fig. 5: Secuencia del gen MICA donde se observa el STR (GCT)_n. Parte de la secuencia de nucleótidos del ADN del gen MICA correspondiente al exón 5. La secuencia de abajo (azul) muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína con la repetición de polialaninas en la posición 293 (Ala)_{1,2,3,4}.

El número de repeticiones de este microsatélite va de 4-9 (GCT)₄₋₉, nombradas como A.4, A.5, A.6, A.9 [\(24\)](#) y finalmente el A.5.1 que es idéntico a A.5 excepto porque presenta un nucleótido extra (G) inserto entre la segunda y tercera repetición (GCT → GGCT) y causa un codón de terminación, (Ala)₂-stop en la posición 310, dando origen a una proteína truncada a la que le faltan 73 aminoácidos en su porción carboxiterminal.

1.1.2- GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA:

Factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF)

El MIF (MIM*153620) es otra molécula integral de la respuesta inflamatoria que, directa o indirectamente, promueve la producción o expresión de citoquinas tales como $TNF\alpha$ e $INF\gamma$, además de incrementar la producción de NO en las células. Aunque la función principal de MIF es hacer que los macrófagos permanezcan en el sitio de la invasión.

El MIF es producido por células como monocitos, macrófagos, células B, T y células NK, células endoteliales y epiteliales [\(25, 26\)](#).

El gen MIF, que consta de 3 exones separados por dos intrones, y cubre menos de 1Kb [\(27\)](#), se localiza en el cromosoma 22q11.2 (*fig. 6*). La estructura de la región promotora varía por la presencia de un tetranucleótido que consiste en 5-8 repeticiones de CATT (-794 CATT₅₋₈; rs35688089).



Fig. 6: Estructura del gen MIF localizado en el cromosoma 22. El gen contiene tres exones y dos intrones. En la región promotora, los lugares de unión de diferentes factores de transcripción se representan en forma de rombos: Ap-1, GATA-1, NF- κ B, SP-1, AP-1, CREB, SP-1 y CREB, de izquierda a derecha. En esta misma región promotora existe un STR en la posición -794 compuesto por 4 nucleótidos (CATT).

Las variantes alélicas de MIF se han mostrado como biomarcadores de varias enfermedades con componente inflamatorio y se han asociado con varias EAs como AR (28), LES (29) y artritis idiopática juvenil (AIJ) (30).

Interferón gamma (INF γ)

El INF γ (MIM*147570) es una citoquina producida por las células NK, células Th1, células CD8⁺ y células T efectoras, macrófagos, células B y células dendríticas (31). Una de las funciones esenciales del INF γ es la activación de los macrófagos, resultando en el incremento de la fagocitosis y el aumento de la expresión de los MHC de Clase I y II y la inducción óxido nítrico (NO) y superóxido (32).

El INF γ , a diferencia de los otros dos interferones, α y β , a los que no es homólogo, se encuentra codificado por un gen localizado en el cromosoma 12 (12q24.1) (33) y contiene tres intrones y cuatro exones (34) (fig. 7).



Fig. 7: Esquema del gen del INF γ localizado en el cromosoma 12. El gen INFG contiene 4 exones (cajas verdes) y los tres intrones (líneas horizontales). El polimorfismo de interés contiene una repetición de dos nucleótidos CA que se localiza en el intrón 1 (posición +1349).

El primer intrón del gen contiene un microsatélite altamente polimórfico (rs2234688) que consiste en repeticiones de dos nucleótidos (CACACA....) en la posición +1349.

La expresión aberrante del gen INFG, que codifica esta citoquina se ha asociado en trabajos anteriores con EAs y auto-inflamatorias [\(35, 36, 37\)](#)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)

El TNF α (MIM*191160) es una citoquina con diversas funciones biológicas que, al igual que las anteriores, promueve una fuerte respuesta inflamatoria y en macrófagos produce activación e induce la producción de NO. Es producida por las células Th1, algunos Th2, macrófagos y demás células inflamatorias.

La proteína TNF α consta de unos 233 aminoácidos y es codificada por un gen localizado en el cromosoma 6 (6p21.31), situado muy cerca de los genes HLA [\(38\)](#) (*fig. 8*).



Fig. 8: Estructura del gen TNFA. El gen TNFA, localizado en el cromosoma 6, contiene 4 exones y tres intrones. El SNP estudiado en este trabajo (rs1800629) se encuentra en la región promotora, en la posición -308, y consiste en una sustitución puntual de una A por una G.

El gen consta de cuatro exones y tres intrones y presenta un SNPs funcional (rs1800629) en la región promotora, en la posición -308A/G, cuyo alelo menos frecuente "A" provoca el incremento de la expresión

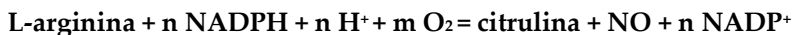
de TNF α (39) y que se ha visto asociado en trabajos anteriores a AR, LES (40), Esclerosis múltiple (41) y cirrosis hepática primaria (42).

El SNP estudiado del TNFA, provoca un incremento de la expresión de la proteína contribuyendo a amplificar y mantener la inflamación y podría actuar en la pérdida de tolerancia y en la inducción de la autoinmunidad. Esta citoquina también se ha visto asociada con la diferenciación y la proliferación de las células T, participando en la actividad pro-inflamatoria de las EAs (43). Sin embargo, nuestro estudio no pudo encontrar una asociación entre este polimorfismo y la EM.

Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS)

El óxido nítrico (NO) es una molécula mensajera que presenta diversas funciones en el organismo.

La NO es producto de la óxido nítrico sintasa (NOS), una enzima que cataliza la reacción que convierte la L-arginina a Citrulina, produciendo a su vez el NO.



Existen tres isoformas de la enzima NOS que se diferencian entre sí por su localización en los diferentes tejidos y por sus diferentes funciones.

Encontramos la NOS inducible, codificada por el gen NOS2A, la NOS neuronal (gen NOS1), y la NOS endotelial (gen NOS3) (*Tabla 1*).

La NOS1 y NOS3 son Ca²⁺-calmodulina dependientes y producen pequeñas cantidades de NO que median procesos de vaso-relajación y

neurotransmisión [\(44\)](#). La NOS inducible no es dependiente de las elevaciones del Ca^{2+} en la célula y se expresa en respuesta a citoquinas [\(45\)](#) produciendo elevadas cantidades de NO que actúa de manera citotóxica o citoprotectora [\(46\)](#).

Proteína	Gen	Ubicación	Función
NOS inducible (iNOS)	NOS2A	S. Inmune S. Cardiovascular	Defensa inmune Vasodilatación
NOS neuronal (nNOS)	NOS1	Tejido Nervioso	Transmisión neuronal
NOS endotelial (eNOS)	NOS3	Endotelio	Vasodilatación

Tabla 1: Ubicación y función de los tres genes de la enzima óxido nítrico sintasa. La NOS1, NOS2A y NOS3 son las encargadas de la producción de NO en la célula.

En este capítulo se estudia la iNOS, relacionada con el sistema inmunológico.

Se ha demostrado que la inducción de la iNOS (MIM*163730) es producida por citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-3 e $\text{INF}\gamma$, tanto en ratones como en humanos [\(47\)](#). Esto, junto a demostraciones de que el promotor de iNOS es dependiente de $\text{NFK}\beta$, demuestra que la transcripción de iNOS es estimulada y mediada por procesos inflamatorios.

El gen de la iNOS, se denomina NOS2A, se localiza muy cerca del centrómero del cromosoma 17 (17q.11.2-q12) [\(48\)](#) y tiene 26 exones que varían de tamaño entre ellos [\(49\)](#). Este gen presenta una variante

(rs3833912) altamente polimórfica compuesta por la repetición de cinco nucleótidos (CCTTT) en la posición -2,6Kb que tiene un papel primordial en la transcripción del gen [\(50\)](#).

Una inducción de iNOS aberrante está envuelta en la fisiopatología y en la respuesta inmunológica de varias enfermedades, algunas de ellas autoinmunes como AR [\(51\)](#), esclerosis múltiple, CU y psoriasis (PS), así como en algunas enfermedades neurodegenerativas [\(52\)](#). También otras enfermedades han sido asociadas a este microsatélite, como la malaria [\(53\)](#), la demencia con cuerpos de Lewy [\(54\)](#) y el glaucoma [\(55\)](#).

1.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA (RIA)

1.2.1- GENES HLA:

En la mayoría de las asociaciones genéticas con EAs están involucrados los genes del HLA, principalmente polimorfismos del MHC de clase II, pero algunas son casi exclusivamente asociadas con polimorfismos de genes de MHC clase I.

El sistema **HLA** (*Human Leukocyte Antigens*) o **Complejo Mayor de Histocompatibilidad** (*MHC-major histocompatibility complex*, en inglés) está formado por un conjunto de Ags que se localizan en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo y tienen la función de discernir entre lo propio y lo extraño. Las moléculas del HLA se encargan de presentar péptidos a los receptores específicos en los linfocitos T (TCR) y los receptores KIR, en las células NK [\(56\)](#).

Las moléculas HLA se dividen en tres grandes grupos (*fig. 9*):

- **Genes MHC-I:** A, B, C, E, F, G.
- **Genes MHC-II:** DM, DO, DP, DQ, DR. Además de otros como LMP2, LMP7, Tap1, Tap2, etc.
- **Genes MHC-III:** MICA, MICB, TNF, LTB, LTA, C4 y C2.

Las moléculas de clase I están constituidas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena de mayor tamaño (cadena pesada) que por un extremo se introduce en la membrana celular y posee tres dominios extracitoplasmáticos ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$).

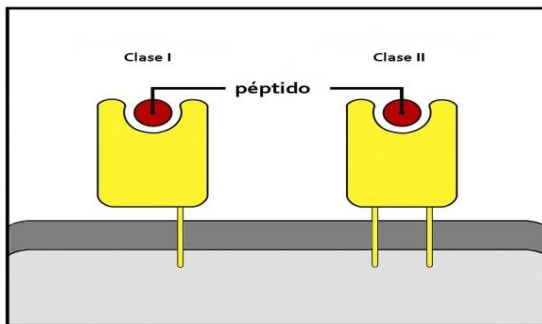


Fig. 9: Representación gráfica de las moléculas de HLA Clase I (izda.) y Clase II (dcha.). La molécula de Clase I está constituida por una cadena pesada y una cadena ligera. La molécula de Clase II está constituida por dos cadenas pesadas [\(10\)](#).

La cadena pesada es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo antigénico de las moléculas de histocompatibilidad clase I. La otra cadena es la β -2 microglobulina y ésta es invariante. Estas moléculas se encuentran en todas las células nucleadas [\(57\)](#).

Las moléculas de clase II están formadas por dos cadenas, ambas con un dominio transmembrana, cadena α y β , o pesada y ligera. Ambas

cadena poseen dominios extracitoplasmáticos, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, la cadena pesada y $\beta 1$ y $\beta 2$, la cadena ligera. La expresión de las moléculas de clase II se encuentra restringida fundamentalmente a las CPAs: macrófagos, monocitos, y linfocitos B. También se pueden expresar en linfocitos T y células NK después de su activación.

Los loci que codifican a las moléculas del HLA se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6, probablemente la región más estudiada del genoma humano (*fig. 10*).

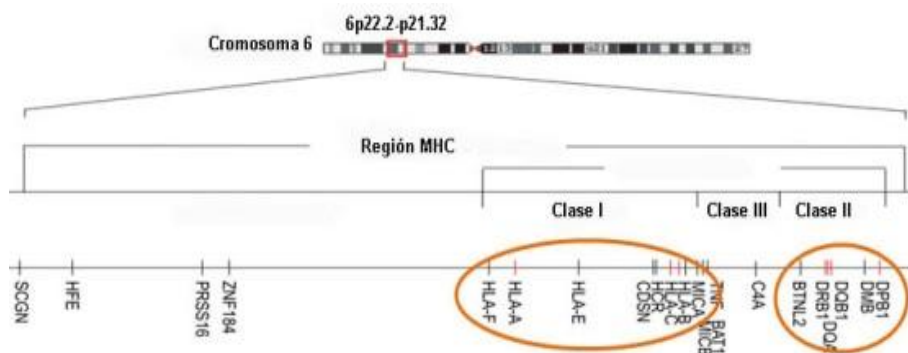


Fig. 10: Mapa esquemático de la región MHC. Los genes HLA (representados dentro de los círculos rojos) están localizados en el brazo corto del cromosoma 6. (Fig. modificada de [58](#)).

Las moléculas HLA de Clase I, codificadas por los genes HLA-A, -B, -Cw, interactúan con el TCR del linfocito T CD8⁺, así como con el receptor KIR de las células NK. Estos locus constan de 8 exones: el exón 1 es el encargado de codificar para el péptido señal líder, el exón 2-3 se transcribe en el dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$, siendo el exón 4 el encargado del dominio $\alpha 3$, finalmente el exón 5 codifica la región transmembrana de la proteína y el exón 6, 7 y 8 lo harán para la cola citoplasmática.

Las moléculas HLA de Clase II son codificadas, entre otros, por los genes HLA-DRB1 y el HLA-DQB1 que están compuestos por 6 exones: el exón 1 codifica para el péptido señal, los exones 2 y 3 codifican para los dos dominios extracelulares, el exón 4, la región transmembrana y los exones 5 y 6, para la cola citoplasmática.

Los genes del HLA están localizados muy cerca de otros genes con importancia en los procesos autoinmunes y esta cercanía provoca la existencia de LD entre ellos. Este LD hace que sea difícil discernir si algunas asociaciones genéticas de EAs se deben a los genes del HLA estudiados o a las asociaciones secundarias entre dichos genes [\(59\)](#).

1.2.2- GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS T Y MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA RIA.

Existen dos genes que, junto a los genes del HLA Clase II, codifican moléculas que son cruciales en la cascada inmune y están implicados en la activación de las células T [\(60\)](#). Ambos genes codifican proteínas integrales del sistema inmunológico que están activamente implicadas en el proceso de activación de las células T.

Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4)

El primer gen que estudiaremos, el CTLA4, codifica la secuencia que dará lugar a una molécula expresada en la mayoría de los linfocitos T activados. Esta molécula es homóloga a CD28 y se une al ligando CD80/CD86. Mientras que CD28 tiene un papel crítico en el incremento y

mantenimiento de la respuesta de las células T comprometidas con los receptores TCR, la interacción de este ligando, CTLA4, tiene por el contrario un efecto inhibitorio de la activación de las células T, al mismo tiempo que una inhibición en la producción de citoquinas, contribuyendo todo esto a la tolerancia periférica.

En resumen, su función es regular la homeostasis y la tolerancia periférica inmunológica, inhibiendo la activación de los linfocitos T.

Todo lo anterior ha sido demostrado en ratones deficientes de CTLA4 que mueren a las 3-4 semanas debido a la infiltración linfocítica y la posterior destrucción de los tejidos [\(61\)](#).

El gen CTLA4 (MIM*123890), localizado en el cromosoma 2 (2p.33.1) ha sido asociado con EAs como la enfermedad de Graves (EG) [\(62\)](#), DT1 [\(62\)](#), hipotiroidismo autoinmune (HA) [\(63\)](#), Bronquitis crónica [\(64\)](#) y enfermedad de Addison [\(65\)](#).

Por estas razones, resultó interesante estudiar un SNP (rs231775) en el exón 1 que consiste en la sustitución de una G por una A, y que finalmente se corresponde con una sustitución no sinónima que resulta en el cambio de un aminoácido en la posición 17 (Thr por Ala) de la proteína.

La expresión en la superficie celular de CTLA4 es influenciada por los polimorfismos en su secuencia. El alelo G en la posición +49 del exón 1 del gen CTLA4 afecta a la función de CTLA4 y está asociado con una

expresión alterada de la proteína [\(66\)](#) que condiciona una reducción en su capacidad de regularla y su consecuente alterada activación de las células T [\(67\)](#).

Fosfatasa de tirosina tipo 22 (PTPN22)

El segundo gen que estudiamos en este caso, fue el PTPN22. Las proteínas PTPs (proteínas tirosina-fosfatasas) juegan un papel fundamental en la regulación de la señalización de los TCRs durante el proceso de la activación de las células T.

Existen un gran número de genes que codifican proteínas que pertenecen a esta familia, pero uno en concreto, el gen PTPN22 codifica a un tipo de PTP denominada LYP (tirosina fosfatasa linfoide) que es un potente modulador de la señalización de TCR y cuya inhibición puede beneficiar el desarrollo de la autoinmunidad. La proteína LYP se expresa en el citosol y en el núcleo de las células T [\(68\)](#). Ha sido relacionada con varias EAs incluyendo DT1, EG, LES, hipotiroidismo autoinmune y AR [\(69,70,71\)](#).

El gen PTPN22 (MIM*600716) se expresa en las células T, células B, monocitos, neutrófilos, células dendríticas y células NK.

Existe un SNP en este gen (rs2476601) que consiste en la sustitución de una C por una T en la posición +1858 que resulta en un cambio de aminoácido de Arg a Trp en el codón 620, modificando el dominio rico en Prolina que se une al dominio de CsK (*fig. 11*).

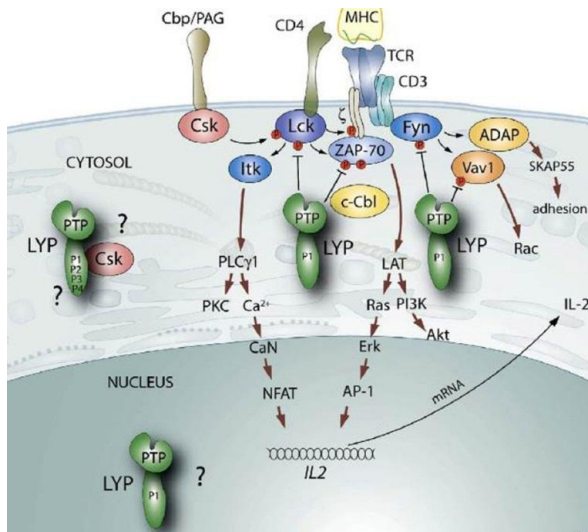


Fig. 11: Mecanismo de acción de la fosfatasa de tirosina linfocítica. El SNP estudiado provoca una mutación sin sentido cambiando una C por una T. Los pacientes heterocigóticos para el alelo mutante, en respuesta a la unión TCR/CD28 están predispuestos a la enfermedad debido a que la fosfatasa se encuentra significativamente más activa, lo que suprime mejor la señalización TCR y producen menos cantidad de IL-2 que los pacientes homocigotos para el alelo no mutante [\(73\)](#).

Experimentos *in vitro* han demostrado que el alelo T de este SNP provoca una unión menos eficiente a Csk que como lo hace el alelo C [\(72\)](#). Esa variante suprime la señalización TCR durante el desarrollo tímico, resultando en la supervivencia de las células T auto-reactivas que deberían haber sido eliminadas por la selección negativa. Los individuos homocigotos para ese SNPs tendrían un umbral más alto para la delección de clones auto-reactivos por lo que esos clones escaparían de ser eliminados, debido a que el alelo que predispone a la autoinmunidad codifica para una fosfatasa significativamente más activa, lo cual suprime mejor la señalización TCR que cantidades idénticas producidas por el alelo normal [\(73\)](#).

Un trabajo realizado con una población del norte de Suecia con 291 pacientes con PsA y 795 controles, encontró que los genotipos CT y TT estaban incrementados en los pacientes con PsA ($\chi^2=6.56$; $p=0.01$; $OR=1.49$ (95%IC 1.10-2.02), donde la frecuencia alélica observada fue de 0.16 para el alelo T en pacientes frente al 0.11 de los controles [\(74\)](#).

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Pacientes

Los pacientes con EM fueron seleccionados desde Enero de 2006 hasta Noviembre de 2011 y se diagnosticaron conforme a la escala diagnóstica para la EM de la AAO-HNS [\(75\)](#).

El grupo de pacientes comprendía enfermos de EM bilateral (EMB) y EM unilateral (EMU). Los pacientes con EM probable fueron excluidos de los estudios. Se cumplieron las mismas implicaciones éticas que en el cap. II.

Los pacientes pertenecían a tres cohortes diferentes:

- *Cohorte 1*: pacientes con EM procedentes del Complejo hospitalario de Santiago de Compostela y Complejo hospitalario universitario de Pontevedra.
- *Cohorte 2*: pacientes con EM procedentes del Hospital de Poniente, Almería; Hospital de la Fe, Valencia; Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada y Hospital Universitario de Salamanca.

Ambas cohortes (cohorte 1 y 2) son de origen caucásico y encontramos sus características sociodemográficas en la *tabla 8*.

- *Cohorte 3*: Usada como cohorte de replicación y compuesta por pacientes con EM procedentes del *House Research Institute* en Los Ángeles (en el estudio del gen MIF) y del Departamento de Otolología Molecular de la Universidad de Iowa (para el estudio del gen NOS2A).

Controles

Las muestras de voluntarios españoles usados como controles fueron obtenidas del Banco Nacional de ADN (www.bancoadn.org) situado en Salamanca y pertenecían a las mismas regiones geográficas de las que eran originarios los pacientes.

Para los controles, los parámetros sociodemográficos fueron equivalentes a los de los casos (*tabla 8*).

Diseño del estudio

Para realizar los siguientes estudios de asociación génica con la EM se realizaron estudios retrospectivos de casos-contróles.

Extracción de ADN

El ADN genómico de pacientes y controles fue aislado desde sangre periférica total tratada con anticoagulante EDTA mediante el robot de extracción GenoVision M-48 (*Qiagen, Venlo, The Netherlands*) y el kit de extracción MagAttract DNA Blood Mini M48 (192) de Qiagen.

Para la cohorte americana, el ADN de los pacientes se extrajo de saliva usando el kit de Oragene de DNA Genotek (Canadá).

Controles de calidad

La cantidad y calidad del ADN fue determinada utilizando medidas de absorbancia (*Nanodrop 2000c, ThermoScientific*) y los índices 260/280 y 230/260 para determinar el grado de contaminación, descartándose las muestras que presentaban una ratio $A_{260}/A_{280} < 1.8$. La cantidad de ADN fue determinada mediante fluorimetría, con el fluorómetro Qubit y kits de tecnología Quant-iT (*Invitrogen*). La calidad e integridad del ADN se evaluó utilizando geles de agarosa al 1% de concentración.

Para confirmar el tamaño de los fragmentos de STRs se genotiparon algunas muestras homocigotas. Y para los SNPs, las muestras se analizaron por duplicado con un blanco para descartar los posibles errores por contaminación y una muestra control en cada placa.

Para asegurar que se cumplía un equilibrio genético dentro de nuestros estudios, se confirmó el EHW en el programa Arlequín ver. 3.1.

Genotipado de STRs y SNPs

Los primers o cebadores y el método de análisis utilizado para el genotipado de los distintos genes aparecen en la tabla siguiente (*tabla 2*).

Gen	Variante	Primers (Forward/Reverse)
MICA	STR (GCT) ₄₋₉	5'-CCT TTT TTT CAG GGA AAG TGC-3' 5'-CCT TAC CAT CTC CAG AAA CTG C-3'
INF γ	STR (CA) ₁₁₋₁₈	5'-GCT GTC ATA ATA ATA TTC AGA C-3' 5'-CGA GCT TTA AAA GAT AGT TCC-3'
MIF	STR (CATTT) ₅₋₈	5'-TTG CAC CTA TCA GAG ACC-3' 5'-TCC ACT AAT GGT AAA CTC G-3'
TNF α	SNP (G/A) rs2476601	*5'-GAG GCA ATA GGT TTT GAG GGG CAT G(A/G)G GAC GGG GTT CAG CCT CCA GGG TCC-3'*
NOS2A	STR (CCTTT) ₈₋₁₆	5'-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTG CAT-3' 5'-GCC ACT GCA CCC TAG CCT GTC TCA-3'
CTLA4	SNP (G/A) rs231775	* 50-GGCACAAGGCTCAGCTGAA CCTGGCT[A/G]CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT
PTPN22	SNP (T/C) rs2476601	5'-CCA GCT TCC TCA ACC ACA ATA AAT G-3' 5'-CAA CTG CTC CAA GGA TAG ATG ATG A -3'

Tabla 2: Tipo de variante estudiada en cada gen y primers usados para realizar las amplificaciones (PCRs). (*primers suministrados por AB).

» Metodología para el genotipado de los STRs:

Para poder aumentar la cantidad de copias del gen de interés y que éstas puedan ser detectadas en las técnicas a utilizar, se realiza una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN extraído con los primers específicos de cada gen, uno de esos primers va marcado para que pueda ser detectado posteriormente (tabla 3).

Reactivo	Volumen
Master Mix Ampli Taq (AB)	7,5 μ l
Primer forward	0,3 μ l
Primer reverse	0,3 μ l
Agua destilada	4,5 μ l
ADN [15ng/ μ l]	2,0 μ l

Tabla 3: Componentes y volumen necesarios para la PCR.

Las condiciones de estas PCRs fueron las siguientes (fig. 12):

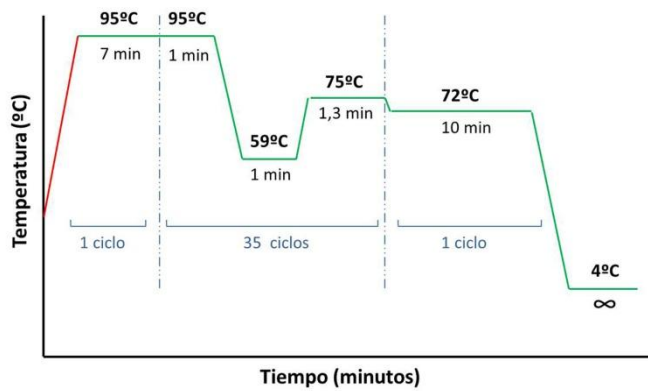


Fig. 12: Condiciones de la PCR para los STRs.

Tras la amplificación, se desnaturalizan los amplicones resultantes, para que ambas hebras se separen y puedan ser analizadas (tabla 4).

Reactivo	Volumen
Formamida	9,5 µl
Estándar de tamaño (500pb marcado en naranja-LIZ)	4,5 µl
Producto amplificado	2,0 µl
Condiciones de la desnaturalización	96°C, 3 min

Tabla 4: Reactivos y condiciones necesarias para la desnaturalización del ADN.

Finalmente se introducen en el secuenciador para realizar una electroforesis capilar y determinar el tamaño de los fragmentos. Esta electroforesis se hace a través de un polímero incluido en un capilar en el que están situados los electrodos encargados de provocar la

diferencia de potencial que generará el movimiento de los fragmentos a través del capilar según su tamaño.

Este secuenciador fue un Analizador Genético ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y los tamaños se determinaron mediante el software GeneMapper® v.4.0 (AB). Este programa permite un rápido análisis de los resultados realizando la identificación de los fragmentos de ADN y calculando su tamaño en número de nucleótidos, la altura y el área de los picos.

El software está dotado de múltiples algoritmos de control de calidad específicos informando de la fiabilidad de los genotipos obtenidos.

» Metodología para el genotipado de los SNPs:

El genotipado de los SNPs se realizó mediante discriminación alélica por sondas TaqMan de AB.

Las sondas TaqMan permiten discriminar entre los dos alelos de un SNP específico gracias a la realización de una PCR (*tabla 5*) donde añadimos unas sondas marcadas con un fluorocromo que emite luz a diferente bioluminiscencia para cada alelo. Una sonda va marcada en VIC detectando la secuencia del alelo 1 y la otra sonda va marcada en FAM detectando así la secuencia del segundo alelo. Cuando un individuo emite ambos fluorocromos indica que estamos frente a un genotipo heterocigoto.

La lectura de las muestras se realiza en un sistema “7500 Fast Real-Time PCR” y la visualización de los resultados mediante un software llamado SDS. El software SDS usa un avanzado algoritmo de multicomponentes para calcular la señal con la que se ha marcado cada alelo midiendo la fluorescencia para cada muestra durante la lectura.

Reactivo	Volumen
2x TaqMan® Universal PCR Mix (AB)	2,5 µl
Primers 330nM, sondas MGB TaqMan	0,05 µl
Agua libre de ADNAsas	1,45 µl
ADN [10ng/ µl]	1,00 µl

Tabla 5: Componentes y volumen necesarios para la PCR.

Las condiciones de las PCRs para los SNPs fueron las siguientes (fig. 13):

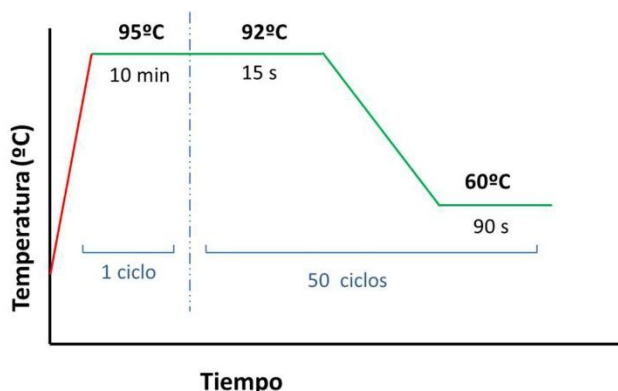


Fig. 13: Condiciones de la PCR para el análisis mediante sondas TaqMan

El sistema de análisis genera una imagen gráfica de los resultados permitiendo que, de manera automática, se determinen los genotipos y el análisis de los resultados (fig. 14).

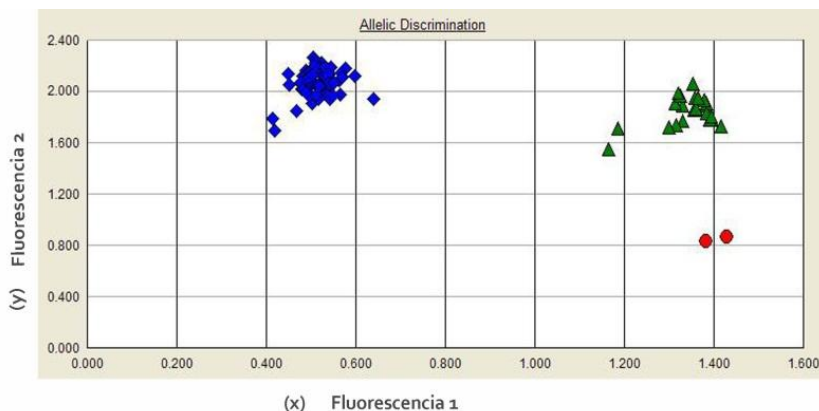


Fig. 14: Resultado de la discriminación alélica obtenido de una de las placas. Los rombos azules representan los individuos homocigotos para un alelo, los círculos rojos a los individuos homocigotos para el otro alelo, y los triángulos verdes a los individuos que portan los dos alelos y, por tanto, son heterocigotos.

» Metodología para el tipaje HLA:

Existen diversos métodos para el tipaje del HLA. Habitualmente el método utilizado es el serológico que se realiza enfrentando los Ags del individuo con los Acs específicos, pero los métodos basados en una PCR previa permiten una discriminación alélica del tipaje mucho más específica, capaz de distinguir diferencias de un único nucleótido, discriminando así mayor cantidad de alelos, y es el que usamos en este trabajo.

Las muestras de este experimento fueron tipadas mediante tecnología Dynal que consiste en una PCR previa usando sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSO) (*Dynal RELI™ SSO*, *Dynal Biotech, Bromborough, UK*).

Este método realiza una amplificación del ADN por PCR (*tabla 6*), con cebadores o primers biotinilados específicos de los genes que buscamos del HLA.

Reactivo	Volumen
Master Mix	15 μ l
Solución MgCl ₂	7,5 μ l
Agua libre de ADNasas	1,45 μ l
ADN [13-15ng/ μ l]	7,5 μ l

Tabla 6: Componentes y volumen necesarios para la PCR del tipaje HLA.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes (*fig. 15*):

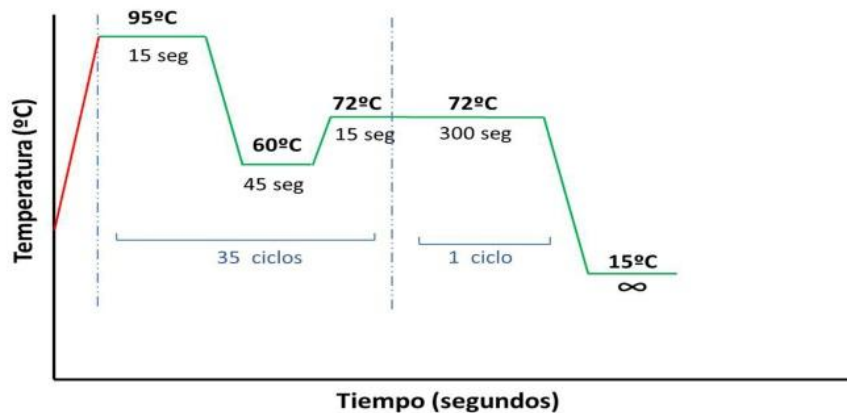


Fig. 15: Ciclos de temperaturas para la PCR.

Cada uno de los amplicones resultantes se hibridan a unas sondas (Sequence Specific Oligonucleotide, SSO) inmovilizadas en unas bandas sobre una membrana de nylon (*fig. 16*).

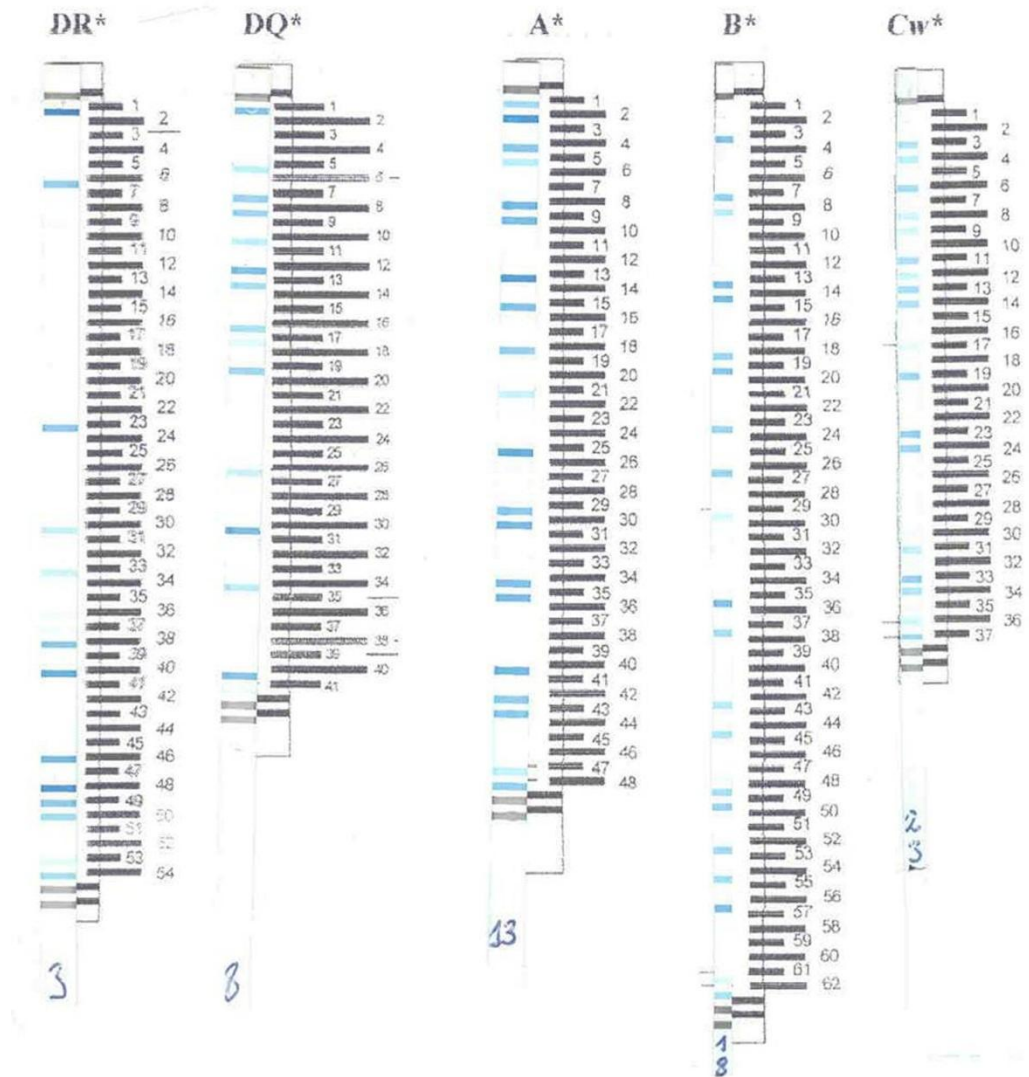


Fig. 16: Foto de las bandas de nylon. Cada banda porta con cada una de las sondas específicas a las que se unen las muestras de ADN resultando en una reacción colorimétrica azul que permite la interpretación alélica de cada individuo.

Las sondas están previamente diseñadas para que hibriden con las secuencias polimórficas de los genes HLA y se unirán solamente a su secuencia complementaria en el ADN amplificado.

El proceso de hibridación consta de diferentes pasos que se reflejan en la *tabla 7*.

Proceso de hibridación (Sequence Specific Oligonucleotide, SSO)
Añadir 30 µl de desnaturalizante para separar las hebras de ADN de los amplicones. Incubar 10 min.
Colocar las tirillas de hibridación en cada departamento de la cubeta.
Añadir 5 ml de buffer de hibridación a cada departamento donde se encuentran las tirillas y 70 µl del ADN desnaturalizado. Incubar 30 min a 50°C.
Aspirar el contenido de cada departamento y añadir 5 ml de buffer de lavado. Esperar unos segundos y aspirar.
Dispensar 5 ml de buffer de lavado Stringent y volver a incubar a 50°C durante 15 min. Eliminar el contenido de los compartimentos
Añadir 5 ml de solución de conjugado e incubar 15 min. Eliminar aspirando el contenido.
Dispensar 5 ml de buffer de lavado e incubar 5 min. Repetir los dos pasos anteriores y aspirar.
Añadir 5 ml de buffer citrato e incubar 5 min. Aspirar cada pocillo.
Añadir 5 ml de agua destilada a cada pocillo e incubar 5 min. Repetir 2 veces.
Añadir 5 ml de buffer citrato.
Las tirillas de nylon están listas para ser leídas.

Tabla 7: Proceso de hibridación de las sondas (*Sequence Specific Oligonucleotide, SSO*) sobre las bandas de nylon.

La visualización de los resultados es posible gracias a que las sondas hibridadas (*fig. 16*) son detectadas a través de una reacción colorimétrica que da como resultado un color azul de la banda correspondiente. La lectura del tipaje del HLA es posible gracias al

software Dynal PMP que tras escanear las bandas es capaz de detectar las sondas hibridadas y realizar la interpretación.

Análisis estadístico

Las variables clínicas estudiadas fueron: estadio auditivo, hipoacusia bilateral, progresión de la hipoacusia, frecuencia de vértigo (nº episodios/últimos 6 meses), persistencia de vértigo activo, migraña, hipertensión, tabaquismo, comorbilidad reumática/autoinmune, crisis de Tumarkin, tiempo desde la última crisis, nivel funcional escala AAO-HNS, tiempo de evolución.

Los datos se analizaron usando el SPSS Software v.15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las variables clínicas cualitativas fueron comparadas mediante tablas de contingencia usando la prueba de la χ^2 de Pearson y el test de Fischer en los casos necesarios y las cuantitativas usando el test de la *t de Student*.

Las distribución de frecuencias alélicas y genotípicas observadas fueron calculadas mediante recuento directo y comparadas mediante la prueba de la χ^2 . Además, se calcularon las *Odds ratios* (OR) y los intervalos de confianza del 95% (ICs), entre pacientes y controles. Los valores de $p < 0,05$ fueron aceptados como estadísticamente significativos después de ser corregidos por el método de Bonferroni para el número de comparaciones posibles.

Para el análisis del LD entre el gen HLA-B* y el gen MICA, se analizaron los haplotipos entre ambos genes. Se determinó el parámetro D del LD a partir de una tabla 2x2 y la estandarización de D (D'). Las frecuencias haplotípicas fueron calculadas usando un algoritmo EM (Esperanza-Maximización) para datos genotípicos multilocus cuando la fase gamética es desconocida, mediante el programa Arlequín. El EHW fue testado en las diferentes poblaciones para todos los genes estudiados.

El tiempo transcurrido hasta alcanzar el estadio auditivo 3 o 4 (cuando la hipoacusia es superior a 40dB) y la persistencia del vértigo, determinado para cada variante del polimorfismo de MICA, se realizó mediante el método de Kaplan-Meier. Las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el test de logaritmo de rango. Estas pruebas también se realizaron para la variable vértigo recurrente, considerando a los pacientes que habían presentado episodios de vértigo en los últimos seis meses antes del estudio.

Los niveles serológicos de las citoquinas TNF α e INF γ se analizaron en pacientes y controles mediante una t-Student.

3. RESULTADOS.

En todos los estudios realizados con los diferentes genes se analizaron los pacientes de ambas cohortes (Cohorte 1 y Cohorte 2), cuando estas cohortes se comportaban igual para un gen, es decir, tenían la misma

distribución alélica, éstas fueron consideradas un solo grupo. Cuando aparecían diferencias entre ambas se analizaban de forma independiente.

La Cohorte 3 se utilizó en los casos donde los resultados fueron positivos, como una cohorte de replicación independiente.

3.1. GENES IMPLICADOS EN LA RII.

3.1.1- Gen MICA

Un primer análisis descriptivo de las características demográficas de las poblaciones se presenta en la *tabla 8*.

Variables	Cohorte 1		Cohorte 2	
	EM	Controles	EM	Controles
Individuos (n)	149	144	153	276
Mujeres (%)	52.3	51.4	53.5	51.4
Edad (años)				
Media	55.1	37.2	55.2	38.8
Mediana	57.5	35.5	56	37
Rango	12-79	16-64	15-88	21-64
SD	13.5	13.1	12.9	9.5

Tabla 8: Características sociodemográficas de las dos poblaciones españolas. (n: número de individuos; %: porcentaje de individuos; SD: desviación estándar).

Esta descripción de las poblaciones mostró que ambas cohortes no presentaban diferencias en cuanto a la edad o a la proporción entre hombres y mujeres, tanto en controles como en casos; además, el porcentaje de bilaterales en ambas poblaciones fue similar (datos no mostrados).

El análisis del EHW demostró que las poblaciones de controles se encontraban en equilibrio ($p > 0,05$). Los pacientes unilaterales y bilaterales se comportaban igual para esta variante por lo que fueron considerados un único grupo homogéneo.

Al analizar las frecuencias alélicas del microsatélite encontramos 5 variantes: A.4, A.5, A.5.1, A.6 y A.9.

En la cohorte 2 se encontraron diferencias con el alelo MICA-A.5 entre casos y controles. El alelo MICA-A.5 aparecía en los controles de esta cohorte en una proporción (12,7%) que duplicaba a la de sus casos (6,9%), y con un valor de $p = 0,04$ (O.R=0,51; 0,30-0,84; IC 95%) (*Tabla 9*). Este resultado no se confirmó en la cohorte 1, donde la proporción de MICA-A.5 fue de 13,2% y 11,7% para controles y casos, respectivamente, sin aparecer diferencias significativas entre ambos (*tabla 9*).

Por otro lado, como las distribuciones alélicas de los individuos control entre ambas cohortes (cohorte 1 y 2) no presentaban diferencias entre ellas ($p = 0,75$), se suponía que ambas poblaciones se comportaban igual y se fusionaron ambas cohortes para realizar un meta-análisis con un tamaño de muestra mayor.

Cohorte	Controles	Casos	OR (95% IC)	P valor	Pc
Cohorte 1	N=144	N=149			
A.4	36 (12.5)	29 (9.7)	0.76 (0.45-1.27)	0.29	NS
A.5	38 (13.2)	35 (11.7)	0.88 (0.54-1.43)	0.60	NS
A.5.1	68 (23.6)	82 (27.5)	1.23 (0.85-1.78)	0.28	NS
A.6	110 (38.2)	111 (37.2)	0.96 (0.69-1.34)	0.81	NS
A.9	36 (12.5)	41 (13.8)	1.12 (0.69-1.81)	0.65	NS
Cohorte 2	N=276	N=153			
A.4	82 (14.9)	46 (15.0)	1.01 (0.68-1.50)	0.95	NS
A.5	70 (12.7)	21 (6.9)	0.51 (0.30-0.84)	0.008	0.04*
A.5.1	141 (25.6)	72 (23.5)	0,86 (0.65-1.24)	0.50	NS
A.6	188 (34.1)	121 (39.5)	1.26 (0.95-1.69)	0.11	NS
A.9	70 (12.7)	46 (15.0)	1.22 (0.81-1.82)	0.34	NS

Tabla 9: Distribución alélica del STR del gen MICA para la cohorte 1 y 2. El alelo MICA.A*5 fue menos frecuente en los pacientes con EM que en los controles en la cohorte 2, a diferencia de la cohorte 1 que no compartió estos resultados. (IC: intervalo de confianza; OR: Odds ratio; Pc: p valor corregido; NS: no significativo).

Las frecuencias alélicas para ambas cohortes agrupadas aparecen en la siguiente tabla (*tabla 10*). En esta ocasión no se observaron diferencias entre las distribuciones de casos y controles.

Aunque el alelo MICA-A.5 sigue siendo más frecuente en los controles (12,9%) que en los casos (9,3%), esta diferencia no es estadísticamente significativa.

El alelo que aparece con mayor frecuencia en la población española es el MICA-A.6, con una frecuencia de 35,5% en controles y 38,4% en los pacientes con EM, por lo que podría considerarse el alelo ancestral en dicha población.

STR	Controles 2n=839	Casos 2n=604	OR (95% IC)	P	Pc
A.4	118 (13.7)	75 (12.4)	0.86 (0.64-1.18)	0.36	NS
A.5	108 (12.9)	56 (9.3)	0.69 (0.49-0.97)	0.03	NS
A.5.1	209 (24.9)	154 (25.5)	1.03 (0.81-1.31)	0.80	NS
A.6	298 (35.5)	232 (38.4)	1.13 (0.91-1.41)	0.26	NS
A.9	106 (12.6)	87 (14.4)	1.16 (0.86-1.58)	0.33	NS

Tabla 10: Frecuencias de alelos MICA-STR para controles y casos en la cohorte española agrupada. (OR: Odds ratio; IC: intervalos de confianza; Pc: valor de p corregida; NS: no significativo).

Para analizar la evolución de la hipoacusia en nuestros pacientes, la hipoacusia fue estratificada atendiendo al tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad, mostrando que el estadio auditivo de los pacientes está asociado significativamente con la duración de la EM ($p=0,0015$; *tabla 11*).

Duración de la EM (años)	Nº de pacientes	Estadio de audición; n (%)				p
		1 (n=18)	2 (n=59)	3 (n=157)	4 (n=70)	
0-5	10	7 (6,9)	29 (28,7)	52 (51,5)	13 (12,9)	0,0015
6-10	92	7 (7,6)	18 (19,6)	51 (55,4)	16 (17,4)	
11-15	56	4 (7,1)	7 (12,5)	29 (51,2)	16 (28,6)	
16-20	26	...	3 (11,5)	14 (53,8)	9 (28,6)	
20-25	11	...	1 (9,1)	5 (45,5)	5 (45,5)	
>25	18	...	1 (5,6)	6 (33,3)	11 (61,1)	

Tabla 11: Estado de la audición estratificado por el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad. En la tabla se muestra la progresión de la pérdida de audición en pacientes con EM (n=304).

Si observamos estos datos por períodos de tiempo de duración de la enfermedad (0-5; 6-10; 11-15; 16-20; 20-25; >25 años), la mitad de los pacientes se encontraban en el estadio 3 en el momento del estudio.

La diferencia más notable se observa en los pacientes que llevaban 20-25 años con la enfermedad, los cuales se encontraban repartidos entre el estadio 3 y 4 mayoritariamente. Los pacientes que padecían la enfermedad durante más de 25 años fueron los que peor audición presentaron, encontrándose más del 50 % de éstos en el estadio auditivo 4 con una hipoacusia severa o profunda, lo que concuerda con la evolución de la hipoacusia típica de la enfermedad.

Para el conjunto de todos los pacientes, 18 pacientes se encontraban en el estadio 1 (6,2%), 59 en el estadio 2 (19,7%), 157 en el estadio 3 (51,7%) y 70 en el estadio 4 (22,3%).

Para comprobar cómo afectaba la dotación alélica de los pacientes a la hipoacusia que padecían, se analizó el tiempo transcurrido desde que comienza la enfermedad hasta que se alcanza una hipoacusia superior a 40dB (estadio 3, que es el estadio a partir del cual la hipoacusia comienza a tener una repercusión funcional para el paciente).

Nuestros datos muestran diferencias entre los pacientes portadores del alelo MICA-A.4 y los demás. Así, los pacientes portadores del MICA-A.4 necesitaban 16 años para alcanzar el estadio 3, a diferencia de los demás

pacientes que lo alcanzaban seis años antes que éstos (test de logaritmo de rango, $p=0,0038$; *fig. 17.A*).

Además analizamos también la evolución del vértigo recurrente y los pacientes que tenían el alelo MICA-A.4 presentaban episodios de vértigo recurrente durante 15 años y, sin embargo, en los demás pacientes la mediana de duración de las crisis fue de 11 años desde el inicio de la enfermedad (test de logaritmo de rango, $p=0,048$; *fig. 17.B*).

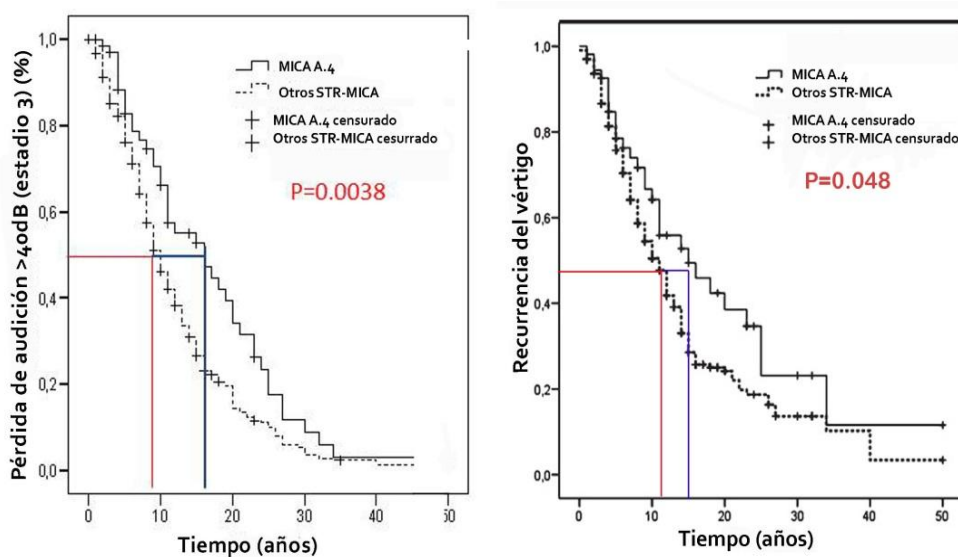


Fig. 17: Representación gráfica del estimador Kaplan-Meier para la evolución de la enfermedad en los pacientes portadores del STR-MICA-A.4 y los no portadores de este alelo. A la izda., pacientes con MICA*A.4 (línea azul) y estadio 3 de pérdida de audición ($p=0,0038$). A la dcha. pacientes portadores del alelo MICA*A.4 (línea azul) y evolución del vértigo ($p=0,048$).

Para evaluar si el resto de variables clínicas presentaban relación con el alelo MICA-A.4 comparamos la bilateralidad, la edad de inicio de la enfermedad, el tipo de cefalea, la historia de EA, el tabaquismo, la

presencia de crisis de Tumarkin y la escala funcional de la AAO-HNS, pero ninguna de esas características se encontraba asociada con ninguno de los grupos.

3.1.2- GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF)

El microsatélite estudiado del gen MIF (rs35688089) presentó en nuestra población de 5-8 repeticiones CATT. Los pacientes con enfermedad uni o bilateral presentaban las mismas distribuciones de frecuencias por lo que se consideraron un grupo común ($p=0.128$).

El alelo más frecuente encontrado en la población española fue CATT₆. La frecuencia del alelo CATT₅ disminuía desde 31% en los controles a 23% en los pacientes con EM en la cohorte española, donde se observaron diferencias significativas para este alelo ($P_c=0.008$, $OR=0.69$ [IC 95%, 0.54-0.88]). Además, el genotipo homocigoto CATT_{5/5} fue observado en el 12% de los controles y un 6% de los pacientes y también mostró diferencias significativas, aunque éstas se encontraban en el límite de la significación ($P_c=0.05$, $OR=0.46$ [95% IC, 0.26-0.82]) (Tabla 12).

Para intentar replicar estos resultados positivos en una cohorte independiente utilizamos la cohorte de pacientes americanos con EM. La frecuencia del alelo CATT₅ no fue diferente entre los pacientes (27%) y los controles americanos (28%). Tampoco hubo diferencias para el genotipo CATT₅₋₅ entre pacientes (27%) y controles americanos (27%).

(CATT)	Controles españoles	EM españoles	Pc	Controles Americano	EM Americanos	Pc
Alelo	2n=984(%)	2n=578(%)	Pc	2n=314(%)	2n=582(%)	Pc
5	303 (30.8)	135 (23.4)	0.008	88 (27.7)	157 (27.0)	NS
6	589 (59.9)	377 (65.2)	NS	190 (60.7)	347 (59.6)	NS
7	91 (9.2)	64 (11.1)	NS	34 (11.0)	76 (13.1)	NS
8	1 (0.1)	2 (0.3)	NS	2 (0.6)	2 (0.3)	NS
Genotipo	N=492(%)	N=289(%)		N=159 (%)	N=291 (%)	
5/5	58 (11.8)	16 (5.5)	0.05*	8 (5.0)	19 (6.5)	NS
5/6	153 (31.1)	90 (31.1)	NS	61 (38.4)	96 (33.0)	NS
5/7	32 (6.5)	13 (4.7)	NS	10 (6.3)	23 (7.9)	NS
5/8	1 (0.2)	0 (0.0)	NS	1 (0.6)	0 (0.0)	NS
6/6	192 (39.0)	124 (42.8)	NS	53 (33.3)	105 (36.1)	NS
6/7	53 (10.8)	41 (14.2)	NS	25 (15.7)	39 (13.4)	NS
6/8	0 (0.0)	0 (0.0)	NS	1 (0.6)	2 (0.7)	NS
7/7	3 (0.6)	5 (1.7)	NS	0 (0.0)	7 (2.4)	NS

Tabla 12: Distribuciones de frecuencias genotípicas y alélicas para el STR estudiado en el gen MIF. En primer lugar aparecen los pacientes y los controles de la población española completa. El estudio de replicación para confirmar los resultados positivos (*) fue realizado en una cohorte americana de origen caucásico, de la que se muestran también las frecuencias alélicas y genotípicas en esta tabla.

Por otro lado, también intentamos relacionar los alelos de este gen con las variables clínicas y el análisis de Kaplan-Meier mostró que la variante alélica CATT₅ no influía en la pérdida de audición ($p=0.65$) ni tampoco en la persistencia del vértigo ($p=0.99$) en los pacientes con EM.

Interferón gamma (INFG)

El STR que estudiamos del IFNG en el intrón 1 (rs2234688) mostró desde 11 a 18 repeticiones al ser genotipado. En la *tabla 13* se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de sus repeticiones.

Genotipo	Controles N= 455 (%)	EM N= 273 (%)	OR (95% IC)	P
11/13	0	2 (0.7)	...	0.14
12/12	111 (24.4)	67 (24.5)	1.01 (0.71-1.43)	0.96
12/13	156 (34.3)	95 (34.8)	1.02 (0.75-1.40)	0.88
12/14	20 (4.4)	13 (4.8)	1.09 (0.53-2.22)	0.82
12/15	14 (3.1)	10 (3.7)	1.20 (0.52-2.73)	0.67
13/13	85 (18.7)	45 (16.5)	0.86 (0.57-1.28)	0.45
13/14	40 (8.8)	23 (8.4)	0.95 (0.56-1.63)	0.86
13/15	13 (2.9)	9 (3.3)	1.16 (0.49-2.75)	0.74
14/14	5 (1.1)	4 (1.5)	1.33 (0.35-5.03)	0.73

Repeticiones	2n= 910 (%)	2n= 546 (%)		
11	3 (0.3)	2 (0.4)	1.11 (0.18-6.67)	1.00
12	415 (45.6)	253 (46.3)	1.03 (0.83 -1.27)	0.78
13	381 (41.9)	220 (40.3)	0.94 (0.75-1.16)	0.55
14	72 (7.9)	46 (8.4)	1.07 (0.73 -1.57)	0.73
15	28 (3.1)	20 (3.7)	1.20 (0.67-2.15)	0.54
16	6 (0.7)	3 (0.5)	0.83 (0.21-3.34)	1.00
17	3 (0.3)	2 (0.4)	1.11 (0.18-6.67)	1.00
18	2 (0.2)	0	...	0.53

Tabla 13: Distribuciones de frecuencias genotípicas y alélicas del STR (rs2234688) del gen. Las distribuciones del INFG para controles y enfermos de Meniere de la población española. La OR del genotipo 11/13 no ha podido ser calculada porque una de las frecuencias fue <5%. (OR: Odds ratio; IC: Intervalos de confianza; p: valor de p).

Los pacientes con enfermedad uni o bilateral no presentaron diferencias entre ellos ($p=0.748$) por lo que fueron unificados en un solo grupo de pacientes. Las distribuciones de los alelos y los genotipos no presentaron diferencias entre pacientes y controles.

El alelo más frecuente en la población fue CA₁₂, tanto en controles (45,6%) como en casos (46,3%).

Ninguna de las repeticiones mostró diferencias cuando fueron estudiadas frente a las variables clínicas, tales como edad de inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad, SNHL bilateral, hipoacusia severa (>75dB), tipo de cefalea, historia de EA, paciente fumador, crisis de Tumarkin y escala funcional del vértigo.

Puesto que el alelo CA₁₂ está asociado a una mayor producción de la citoquina *in vitro*, los pacientes se estratificaron por este alelo (pacientes portadores de CA₁₂ y pacientes no portadores de este alelo). No aparecieron diferencias para ninguna de estas variables y los pacientes portadores o no del alelo CA₁₂ (*tabla 14*).

Los pacientes que portaban el alelo CA₁₂ tenían una duración media del vértigo de unos 12 años, al igual que los pacientes que portaban otro alelo diferente (test de logaritmo de rango, $p= 0.318$) (*fig. 18*).

Para la hipoacusia, la media de edad a la que los pacientes alcanzaban el estadio 4 (>75dB) no mostraban diferencias significativas entre los pacientes portadores o no del alelo CA₁₂ (test logaritmo de rango, $p=0.29$, *fig. 19*), ya que los pacientes con CA₁₂ alcanzaban ese estadio a los 27 años desde el inicio de la enfermedad, a diferencia de los pacientes sin ese alelo que lo alcanzaban a los 24 años.

VARIABLES	CA ₁₂	Otros alelos	P
	(2n=189)	(2n=213)	
Duración de la EM en años (SD)	11 (8.8)	10 (8.3)	0.13
SNHL bilateral, n (%)	131 (49.2)	135 (50.8)	0.28
SNHL severa (>75dB)	54 (45.8)	64 (54.2)	0.22
Edad de inicio (SD)	46 (13.5)	46 (12.7)	0.71
Tipo de cefalea, n (%)			0.79
Migraña	24 (41.4)	34 (58.6)	
Cefalea tensional	41 (43.6)	53 (56.4)	
Historia de EA, n (%)	37 (47.4)	41 (52.6)	0.98
Fumador, n (%)	37 (41.1)	53 (58.9)	0.19
Crisis de Tumarkin n (%)	42 (44.7)	52 (55.3)	0.78
Escala funcional, n (%)			0.63
1	45 (46.9)	51 (53.1)	
2	67 (44.7)	83 (55.3)	
3	35 (53.0)	31 (47.0)	
4	18 (50.0)	18 (50.0)	
5	20 (50.0)	20 (50.0)	
6	4 (28.6)	10 (71.4)	

Tabla 14: Estudio de las variables clínicas de los pacientes con EM portadores del alelo CA₁₂ o del resto de alelos.

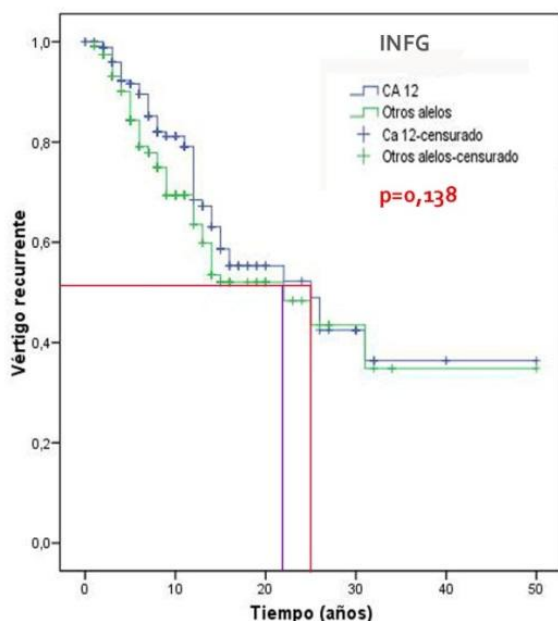


Fig. 18: Evolución del vértigo. Representación gráfica de la evolución de la enfermedad en los pacientes portadores del alelo CA₁₂ y los pacientes portadores de los demás alelos para la recurrencia del vértigo (p=0.138).

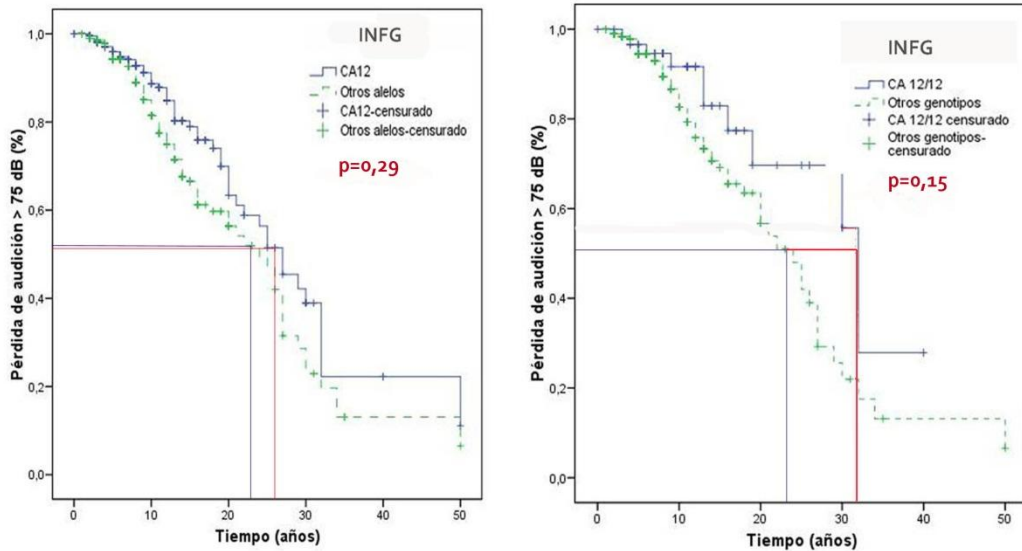


Fig. 19: Curvas de Kaplan-Meier para la evolución de la hipoacusia. A la izda. la figura representa al estudio de los alelos y se representa la evolución de la hipoacusia en los pacientes portadores del alelo CA₁₂ y los demás (p=0.29). A la dcha. la figura muestra el estudio realizado con los genotipos y se representa la evolución de la hipoacusia en los pacientes homocigotos para el alelo CA₁₂ (CA₁₂/CA₁₂) y el resto de pacientes (p=0.15).

Este mismo estudio, se realizó comparando los genotipos de los pacientes homocigotos para ese alelo (CA₁₂/CA₁₂), los cuáles alcanzaban ese estadio 4 auditivo a los 32 años y los que no portaban este genotipo que alcanzaban dicho estadio a los 25 años, aumentando la diferencia al poseer los dos alelos CA₁₂ (homocigosis), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p=0.15).

Factor de la necrosis tumoral alfa (TNFA)

El SNP funcional (rs1800629) presente en el promotor del gen TNFA fue analizado mediante sondas TaqMan.

Los pacientes con EM unilateral o bilateral mostraron las mismas distribuciones de frecuencias alélicas, por lo que se decidió unificar la muestra en un mismo grupo.

Tanto los alelos A o G como los genotipos GG, GA y AA presentaron las mismas frecuencias en los pacientes y en los controles de la población española, y este polimorfismo no pudo ser relacionado con la EM (*tabla 15*).

TNF α	Controles	EM	OR (95% IC)	P
Genotipo	N=552	N=277		
GG	425 (77.0)	218 (78.7)	1.10 (0.78-1.56)	0.59
GA	119 (21.6)	55 (19.9)	0.90 (0.63-1.29)	0.59
AA	8 (1.4)	4 (1.4)	0.99 (0.29-3.34)	1.00
Alelo	2n=1104	2n=554		
A	135 (12.2)	63 (11.4)	0.92 (0.67-1.27)	0.63
G	969 (87,8)	491 (88.6)	1.08 (0.79-1.49)	0.63

Tabla 15: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante -308A/G (rs2476601) del gen TNFA en los pacientes de EM y los controles.

El análisis de Kaplan-Meier no mostró diferencias significativas entre los pacientes que portaban el alelo A ni para los que portaban el alelo G con respecto a la hipoacusia ($p=0.84$) o para la persistencia de los episodios de vértigo ($p=0.47$).

Oxido Nítrico Sintasa inducible (NOS2A)

El microsatélite CCTTT del gen NOS2A (rs3833912) presentó en nuestra cohorte española un rango entre 9-16 repeticiones.

La distribución de frecuencias alélicas de CCTTT entre los controles de la cohorte 1 y 2 fue diferente (*fig. 20*, $P_c=0.04$), por lo que se decidió realizar los análisis de forma independiente entre estas dos poblaciones de diferentes áreas geográficas.

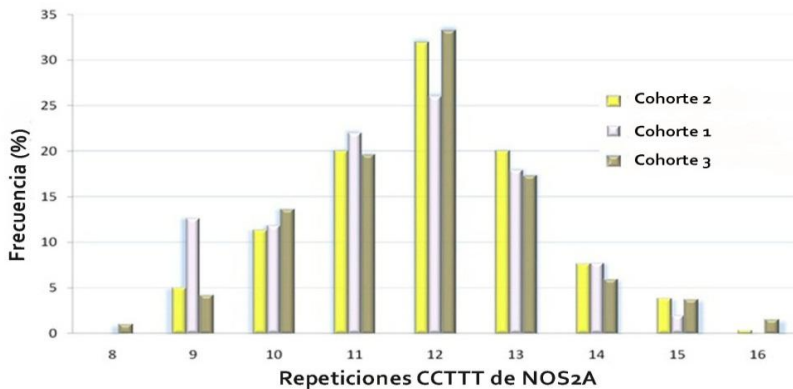


Fig. 20: Histograma de la distribución de las frecuencias de las repeticiones (8-16) del STR del gen NOS2A (CCTTT). Representadas en amarillo aparecen las frecuencias de la cohorte 1, las barras blancas pertenecen a la cohorte 2 y las barras marrones se corresponden con la cohorte de replicación americana.

El número de repeticiones más frecuentes que aparecieron de manera general en todas las cohortes fueron 12 (30%), 11 (21%), y 13 (19%). El alelo más corto en las poblaciones españolas estaba formado por 9 repeticiones.

A continuación, se compararon si existían diferencias entre los pacientes con EM unilateral y bilateral y no se encontraron diferencias entre los de la cohorte 2 ($p=0.21$), ni en la cohorte 1 ($p=0.99$).

En la *tabla 16* se presentan las distribuciones de frecuencias alélicas al comparar los casos frente a los controles.

En la cohorte 1 observamos resultados significativos al comparar los casos y los controles, encontrando que el alelo de 9 repeticiones, (CCTTT)₉, era significativamente más frecuente en controles que en pacientes (OR=0.37 [IC 95%, 0.18-0.76]; p=0,005; p_c=0.04), aunque este hallazgo no se observaba en la segunda cohorte (p=0.35).

Para confirmar el resultado positivo obtenido en la cohorte número 1, el experimento fue replicado en la cohorte americana, donde las diferencias entre las frecuencias alélicas de casos y controles no fueron estadísticamente significativas (p=0,77).

Al analizar la muestra de forma conjunta no aparecieron diferencias (p=0.56), por lo que este polimorfismo no se pudo asociar a la EM.

Además, evaluamos también la relación entre los alelos de la repetición CCTTT y la hipoacusia o los episodios de vértigo de los pacientes. Dado que estudios previos parecen indicar que el número de repeticiones CCTTT está relacionado con el nivel de transcripción del gen NOS2A, y se ha asociado a algunas enfermedades [\(54\)](#) los pacientes se estratificaron según la longitud del microsatélite (repeticiones cortas: 9-10; repeticiones largas: 10 o más).

Cohorte	Controles (%)	EM (%)	OR (95% IC)	p
Cohorte 1	2n=246	2n=216		
9	12.6	5.1	0.37 (0.18-0.76)	0.005*
10	11.8	12.5	1.07 (0.61-1.87)	0.82
11	22.0	19.9	0.88 (0.56-1.39)	0.59
12	26.0	24.1	0.90 (0.59-1.38)	0.63
13	17.9	20.8	1.21 (0.76-1.92)	0.42
14	7.7	13.4	1.85 (1.01-3.41)	0.05
15	2.0	3.7	1.85 (0.60-5.75)	0.28
16	...	0.5	...	0.47
Cohorte 2	2n=684	2n=312		
9	5.0	6.4	1.31 (0.74-2.31)	0.35
10	11.3	16.7	1.58 (1.08-2.31)	0.02
11	20.2	16.7	0.79 (0.56-1.13)	0.19
12	31.9	30.4	0.94 (0.70-1.25)	0.65
13	20.0	19.6	0.97 (0.69-1.36)	0.86
14	7.6	7.4	0.97 (0.58-1.61)	0.90
15	3.8	2.9	0.75 (0.35-1.62)	0.47
16	0.3	1.00
Cohorte 3	2n=404	2n=234		
8	1.0	0.9	0.87 (0.16-4.78)	0.80
9	4.2	4.7	1.13 (0.52-2.46)	0.77
10	13.6	15.8	1.18 (0.75-1.85)	0.45
11	19.6	15.8	0.78 (0.51-1.20)	0.24
12	33.2	32.9	1.00 (0.71-1.41)	0.94
13	17.3	16.2	0.93 (0.61-1.44)	0.72
14	5.9	8.1	1.41 (0.75-2.63)	0.29
15	3.7	2.6	0.69 (0.26-1.80)	0.43
16	1.5	2.6	1.76 (0.56-5.52)	0.33
17	...	0.4	...	0.78
Completa	2n=1334	2n=762		
9	6.1	5.5	0.89 (0.61-1.31)	0.56
10	12.1	15.2	1.30 (1.01-1.68)	0.04**
11	20.3	17.3	0.82 (0.65-1.04)	0.10
12	31.1	29.4	0.92 (0.76-1.12)	0.41
13	18.8	18.9	1.01 (0.80-1.26)	0.94
14	7.1	9.3	1.34 (0.97-1.85)	0.07
15	3.4	3.0	0.87 (0.52-1.45)	0.60
16	0.6	0.9	1.54 (0.56-4.26)	0.40

Tabla 16: Frecuencias alélicas del microsatélite CCTTT (rs3833912) en el gen NOS2A en pacientes con EM. Aparecen ambas cohortes junto a la tercera cohorte de replicación. Los resultados también aparecen representados de manera conjunta en una cohorte completa. (*p<=0.04; **p<=0.32) (Los puntos suspensivos se corresponden a los valores que no pueden ser calculados porque las frecuencias son <5%).

Así, los pacientes con 9 o 10 repeticiones del CCTTT, o repeticiones más cortas, de NOS2A alcanzaban el estadio 4 a los 24 años (20-28), mientras que los pacientes que portaban alelos más largos lo alcanzaban a los 20 años (5-35) (test de logaritmo de rango, $p=0.17$) (fig. 21).

Por tanto, no hubo diferencias en la hipoacusia de los pacientes según su dotación alélica.

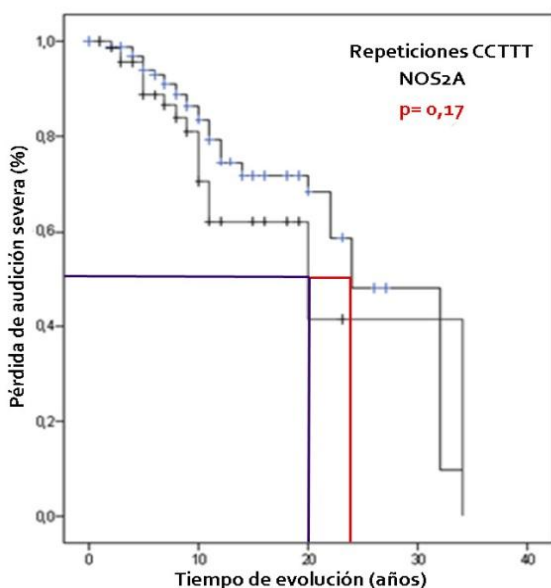


Fig. 21: Curva de la evolución de la hipoacusia y repetición CCTTT. La línea azul representa los años a los que alcanzan una pérdida de audición severa los pacientes portadores de repeticiones largas de CCTTT y la línea roja a los pacientes que portan alelos cortos (9-10 repeticiones) del STR. No se aprecian diferencias entre ambos ($p=0,17$).

3.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.

3.2.1- GENES DEL HLA

Los pacientes con EM y los controles de la población española fueron tipados para los genes HLA (HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 y -DQB1).

Todos los alelos de estos genes HLA fueron analizados independientemente en pacientes con EM uni o bilateral para comprobar

si existían diferencias genéticas entre estas dos variantes clínicas de la enfermedad. Ninguno de los genes reflejó diferencias, por lo que la muestra fue unificada.

Para este análisis se usaron pacientes de la cohorte 1 y 2, pues no mostraron diferencias entre ambos.

El gen HLA-DRB1 fue analizado a alta resolución (cuatro cifras) por presentar un gran número de variantes alélicas, no encontrándose diferencias entre casos y controles (*tabla 17*).

Las dos primeras columnas de la tabla pertenecen a los pacientes con EM uni y bilateral. Las siguientes columnas se corresponden a las distribuciones alélicas de los casos (unilaterales y bilaterales unificados) y de los controles.

En el caso del gen HLA-DQB1 se realizó el mismo análisis que para el gen anterior (*tabla 18*).

Alelo	Tipaje	Unilateral (n=53)	Bilateral (n=48)	Casos (n=101)	Controles (n=821)
<i>DRB1*01</i>	0101	0.07	0.07	0.07	0.07
	0102	0.02	0.02	0.02	0.03
	0103	0.02	...	0.01	0.01
<i>DRB1*15</i>	1501	0.09	0.13	0.11	0.09
	1502	0.02	...	0.01	0.02
	1503
<i>DRB1*16</i>	1601	0.02	0.04	0.03	0.01
<i>DRB1*03</i>	0301	0.06	0.01	0.04	0.11
	0302
<i>DRB1*04</i>	0401	0.01	...	0.01	0.03
	0402	0.05	0.05	0.05	0.02
	0403	0.04	...	0.02	0.03
	0404	0.04	0.04	0.04	0.03
	0405	0.01
	0406	0.01
	0407	0.01	...	0.01	0.02
<i>DRB1*11</i>	1101	0.06	0.07	0.06	0.07
	1102	0.02	0.02	0.02	0.01
	1103	0.02	0.01	0.05	0.01
	1104	0.03	0.06	0.04	0.03
	1133
<i>DRB1*12</i>	1201	...	0.01	0.01	0.01
	1202
<i>DRB1*13</i>	1301	0.05	0.03	0.04	0.07
	1302	0.05	0.12	0.08	0.03
	1303	0.03	0.03	0.03	0.01
	1304
	1305
<i>DRB1*14</i>	1401	0.02	0.03	0.02	0.02
	1402	...	0.01	0.01	0.00
	1404
	1435
<i>DRB1*07</i>	0701	0.23	0.22	0.23	0.17
<i>DRB1*08</i>	0801	0.02	...	0.01	0.02
	0802	...	0.01	0.05	0.05
	0803	0.01	0.01	0.01	0.00
	0804	0.01	...	0.01	0.00
	0806
<i>DRB1*09</i>	0901	0.01
<i>DRB1*10</i>	1001	0.01	...	0.01	0.02

Tabla 17: Frecuencias alélicas del gen HLA-DRB1. Las dos primeras columnas pertenecen a los pacientes con EM uni y bilateral, con el valor de su OR. Las siguientes columnas corresponden a las distribuciones alélicas de los casos (unilaterales y bilaterales juntos) y de los controles, también con su OR. (OR: Odds ratio).

Alelo	Unilateral (n=53)	Bilateral (n=48)	Casos (n=101)	Controles (N=821)
<i>DQB1*02</i>	0.29	0.22	0.26	0.28
<i>DQB1*03</i>	0.32	0.32	0.32	0.31
<i>DQB1*04</i>	0.02	0.02	0.02	0.02
<i>DQB1*05</i>	0.17	0.19	0.18	0.17
<i>DQB1*06</i>	0.19	0.23	0.21	0.20

Tabla 18: Frecuencias alélicas del gen HLA-DQB1. Las dos primeras columnas pertenecen a los pacientes con EM uni y bilateral. Las siguientes columnas corresponden a las distribuciones alélicas de los casos (unilaterales y bilaterales juntos) y de los controles.

Para este gen no se encontraron diferencias entre pacientes unilaterales y bilaterales, ni se observaron diferencias entre las comparaciones de las distribuciones alélicas de los pacientes con EM y los controles.

A continuación, se analizaron las frecuencias alélicas para los genes HLA-A, -B, -Cw. No se apreciaron diferencias entre los casos con EM y los controles en ninguno de los tres genes estudiados. Podemos observar las distribuciones alélicas de estos tres genes en las siguientes tablas.

En primer lugar, realizamos el tipaje del gen HLA-A, como observamos en la *tabla 19*. Ninguno de los alelos presentó diferencias significativas cuando fueron comparados entre los pacientes unilaterales y bilaterales, ni entre estos y los controles.

Alelo	Unilateral (n=53)	Bilateral (n=48)	Casos (n=101)	Controles (n=821)
A*01	0.10	0.06	0.08	0.12
A*02	0.24	0.24	0.24	0.26
A*03	0.08	0.08	0.08	0.10
A*11	0.06	0.03	0.05	0.07
A*23	0.03	0.05	0.04	0.03
A*24	0.08	0.07	0.08	0.09
A*25	...	0.02	0.01	0.01
A*26	0.08	0.06	0.07	0.04
A*28	0.01
A*29	0.06	0.12	0.09	0.08
A*30	0.05	0.09	0.07	0.06
A*31	0.04	0.01	0.03	0.02
A*32	0.03	0.05	0.04	0.04
A*33	0.02	0.02	0.02	0.02
A*34	0.02	...	0.01	0.01
A*36
A*43	...	0.01	0.01	...
A*66	0.02	0.02	0.02	...
A*74
A*80

Tabla 19: Frecuencias alélicas del gen HLA-A. Las dos primeras columnas pertenecen a los pacientes con EM uni y bilateral. Las siguientes columnas corresponden a las distribuciones alélicas de los casos (unilaterales y bilaterales juntos) y de los controles.

El siguiente gen que estudiamos fue el gen HLA-B. Y a continuación el gen HLA-Cw, que presenta menos variantes alélicas que los anteriores. En las siguientes tablas (*tabla 20 y 21*) podemos observar las distribuciones alélicas de estos genes.

Ninguno de estos genes estudiados presentó asociación con la EM, siendo los resultados de los p valores > 0,05.

Alelo	Unilateral (2n=166)	Bilateral (2n=126)	Casos (n=292)	Controles (n=1014)
<i>B*07</i>	0.07	0.07	0.07	0.09
<i>B*08</i>	0.05	0.05	0.04	0.05
<i>B*13</i>	0.01	0.01	0.01	0.02
<i>B*14</i>	0.09	0.04	0.06	0.05
<i>B*15</i>	0.03	0.05	0.04	0.05
<i>B*18</i>	0.06	0.06	0.06	0.09
<i>B*27</i>	0.02	0.05	0.03	0.04
<i>B*35</i>	0.09	0.06	0.08	0.10
<i>B*37</i>	0.03	0.01	0.02	0.01
<i>B*38</i>	0.03	0.02	0.03	0.03
<i>B*39</i>	0.01	0.02	0.02	0.01
<i>B*40</i>	0.04	0.03	0.04	0.03
<i>B*41</i>	0.02	0.02	0.02	0.01
<i>B*44</i>	0.16	0.20	0.18	0.15
<i>B*45</i>	0.01	0.02	0.01	0.01
<i>B*49</i>	0.05	0.04	0.05	0.03
<i>B*50</i>	0.03	0.03	0.03	0.03
<i>B*51</i>	0.09	0.11	0.10	0.09
<i>B*52</i>	0.02	0.02	0.02	0.01
<i>B*53</i>	0.02	0.01	0.01	0.01
<i>B*55</i>	0.01	...	0.01	0.01
<i>B*56</i>
<i>B*57</i>	0.03	0.03	0.02	0.02
<i>B*58</i>	0.01	0.01	0.01	0.01

Tabla 20: Frecuencias alélicas del gen HLA-B. Las dos primeras columnas pertenecen a los pacientes con EM uni y bilateral, Las siguientes columnas corresponden a las distribuciones alélicas de los casos (unilaterales y bilaterales juntos) y de los controles.

Para intentar solventar este problema, se decidió dividir a los pacientes en unilaterales y bilaterales independientemente para que, aunque disminuya aún más la muestra, ésta sea más homogénea. De esta forma, enfrentamos al grupo de pacientes bilaterales con los controles, estudiando sólo este subgrupo más homogéneo entre sí. Sin embargo, no

se encontraron diferencias significativas para ninguno de los genes realizados.

Alelo	Unilateral (n=53)	Bilateral (n=48)	Casos (n=101)	Controles (n=821)
<i>Cw*01</i>	0.03	0.05	0.04	0.03
<i>Cw*02</i>	0.05	0.07	0.06	0.04
<i>Cw*03</i>	0.07	0.09	0.08	0.05
<i>Cw*04</i>	0.11	0.09	0.10	0.15
<i>Cw*05</i>	0.10	0.06	0.08	0.11
<i>Cw*06</i>	0.07	0.10	0.08	0.08
<i>Cw*07</i>	0.24	0.18	0.21	0.24
<i>Cw*08</i>	0.05	0.03	0.04	0.05
<i>Cw*12</i>	0.08	0.13	0.10	0.07
<i>Cw*14</i>	0.02	0.03	0.03	0.01
<i>Cw*15</i>	0.01	0.02	0.02	0.03
<i>Cw*16</i>	0.08	0.07	0.07	0.08
<i>Cw*17</i>	0.02	0.04	0.03	0.01

Tabla 21: Frecuencias alélicas del gen HLA-Cw. Las dos primeras columnas pertenecen a los pacientes con EM uni y bilateral. Las siguientes columnas corresponden a las distribuciones alélicas de los casos (unilaterales y bilaterales juntos) y de los controles.

Posiblemente, uno de los factores que explica estos resultados sería el bajo número de pacientes para la elevada de variabilidad alélica que presentan estos loci o genes.

Debido a la proximidad a la que se encuentra el gen MICA, estudiado anteriormente, del gen HLA-B dentro del cromosoma 6, estos genes presentan LD entre ellos, heredándose en forma de haplotipos.

Por tanto, después de analizar de forma independientemente las distribuciones alélicas del STR del gen MICA, y ahora analizar las

frecuencias del gen HLA-B, nos dirigimos a analizar las frecuencias haplotípicas de ambos genes.

En la *tabla 22* se presentan las frecuencias haplotípicas que presentaron una frecuencia superior al 1,5%. Conforme a lo esperado por la posición cromosómica de ambos genes, se halló un LD positivo entre diferentes alelos de estos genes.

Haplotipo	FH	Grupo Control			Grupo Pacientes			
		D'	LOD	Pc	FH	D'	LOD	Pc
MICA*A.4-B*18	0.05	0.90	36.22	1.2x10 ⁻²⁴	0.04	0.83	17.51	2.6x10 ⁻¹³
MICA*A.4-B*27	0.03	1.00	24.32	5.3x10 ⁻⁹	0.02	0.86	9.35	3.3x10 ⁻⁷
MICA*A.5-B*15	0.03	0.60	11.10	2.1x10 ⁻⁷	0.02	0.39	3.56	1.3x10 ⁻⁵
MICA*A.5-B*35	0.02	0.20	2.21	0.02	0.02	0.10	0.44	5.3x10 ⁻⁴
MICA*A.5.1-B*7	0.06	0.76	22.02	2.0x10 ⁻¹³	0.05	0.86	10.14	4.6x10 ⁻¹⁰
MICA*A.5.1-B*8	0.03	0.68	6.92	5.9x10 ⁻⁶	0.04	0.85	5.97	2.4x10 ⁻⁷
MICA*A.5.1-B*35	0.01	1.00	4.07	0.01	0.01	0.002	0.00	NS
MICA*A.5.1-B*40	0.02	0.20	0.56	NS	0.02	0.28	0.61	0.06
MICA*A.6-B*44	0.07	0.44	4.69	6.1x10 ⁻⁵	0.09	0.33	2.47	0.02
MICA*A.6-B*49	0.02	0.90	5.11	7.2x10 ⁻⁶	0.03	0.82	3.89	6.6x10 ⁻⁴
MICA*A.6-B*50	0.02	1.00	6.02	2.8x10 ⁻⁶	0.03	0.66	2.01	0.02
MICA*A.6-B*51	0.07	0.86	15.54	1.8x10 ⁻¹⁴	0.09	0.83	8.36	3.5x10 ⁻¹⁴
MICA*A.9-B*35	0.02	0.34	6.85	0.02	0.02	0.35	3.53	NS
MICA*A.9-B*57	0.02	0.87	9.70	6.0x10 ⁻¹⁵	0.02	0.89	5.59	2.8x10 ⁻⁷

Tabla 22: Distribución de haplotipos entre el gen MICA y el gen HLA-B. Se muestran los haplotipos más frecuentes (>1,5%) de los genes MICA y HLA-B en la población española. (FH, frecuencia haplotípica; D', medida del desequilibrio de ligamiento; (+D'=1 indica un completo desequilibrio de ligamiento; LOD, logaritmo likelihood de la Odds ratio; Pc: valor de p corregido por el método de Bonferroni; NS: no significativo).

En nuestra cohorte, encontramos 13 haplotipos en el grupo control (tabla 9), siendo los más frecuentes MICA-A.6-HLA-B*44 (7.2%), MICA-A.6-HLA-B*51 (7.4%), y MICA-A.5.1-HLA-B*7 (6.5%). Los haplotipos MICA-

A.5-HLA-B*35 en los casos y el MICA-A.5.1-HLA-B*40 en los controles mostraron un LD marginal para este estudio ($p=NS$) En los pacientes encontramos la misma distribución de frecuencias haplotípicas y no se encontraron diferencias entre controles y casos para este análisis.

Debido al elevado número de haplotipos presentes entre el gen MICA y el HLA-B, se planteó la duda de si la asociación entre la evolución de la hipoacusia y el alelo MICA-A.4, que hallamos en el estudio anterior (apartado del gen MICA), era debida realmente al gen MICA o era el efecto del LD con los alelos del gen HLA-B.

El alelo MICA-A.4 se encontraba formando haplotipo con HLA-B*18 y HLA-B*27, por tanto, se realizó el análisis de Kaplan-Meier para el alelo HLA-B*18 que era el que presentaba el haplotipo con LD más fuerte en nuestra población de pacientes (*fig. 22*).

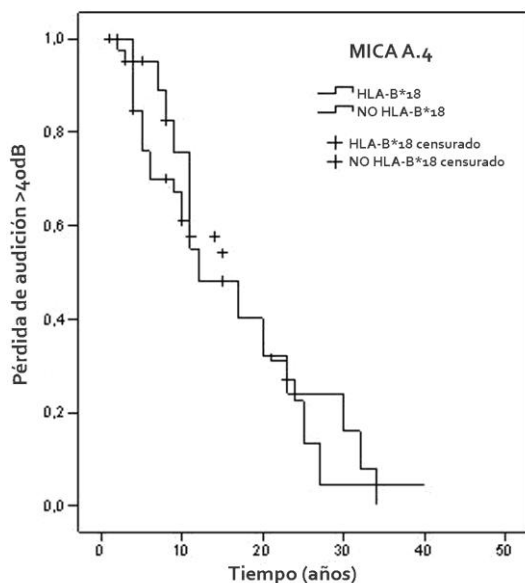


Fig. 22: Análisis de Kaplan-Meier para la evolución de la hipoacusia estratificado para el alelo HLA-B*18. Este estudio se realizó en el grupo de pacientes portadores del HLA-B*18 y además el alelo MICA-A.4. La asociación hallada anteriormente entre la hipoacusia y el alelo MICA*A.4 resultó ser independiente del hecho de estar formando haplotipo con el HLA-B*18.

No se encontraron diferencias entre los pacientes con EM que presentaban el haplotipo MICA-A.4-HLA-B*18 y los que no lo tenían, confirmándose que la hipoacusia estaba asociada al alelo MICA-A.4, independientemente de su asociación con HLA-B*18.

3.2.2- GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS T Y MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.

Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4) y Fosfatasa de tirosina tipo 22 (PTPN22)

Este estudio fue realizado con pacientes seleccionados desde enero de 2007 hasta enero de 2009, cuando nuestra colección de pacientes era más reducida. Debido al bajo número de pacientes con los que contábamos en este estudio decidimos usar sólo los pacientes bilaterales para que la muestra, al menos, fuese lo más homogénea posible. Estos pacientes pertenecían a las cohortes 1 y 2, y ambas no mostraron diferencias entre sí.

Nuestra cohorte mostró una alta prevalencia de cefalea y enfermedad osteoarticular, los cuales podrían ser síntomas de EA.

La *tabla 23* muestra la distribución alélica y genotípica del SNP +49 A/G del gen CTLA4 (rs231775) en pacientes con EMB y controles.

Para este estudio se observó una desviación del EHW ($p=0,02$). Aun así, realizamos una estimación de los resultados y la distribución alélica fue

similar para ambas muestras, no mostrando desviación significativa ni en las frecuencias alélicas ni en las genotípicas para este polimorfismo.

CTLA4	Controles	EM bilateral	OR (95% IC)	P	Pc
Genotipo	N=348 (%)	N=52 (%)			
AA	184 (52.1)	30 (57.7)	1.21 (0.67-2.19)	0.62	NS
AG	153 (43.7)	21 (40.4)	0.86 (0.30-1.56)	0.74	NS
GG	11 (3.1)	1 (1.9)	0.60 (0.07-4.76)	1.00	NS
Alelo	2n=696 (%)	2n=104 (%)			
A	521 (74.9)	82 (78.8)	1.25 (0.76-2.07)	0.45	NS
G	175 (25.1)	22 (21.2)			

Tabla 23: Frecuencia de las distribuciones alélicas de CTLA4 entre los pacientes con EM bilateral y controles sanos

La *tabla 24* muestra las frecuencias alélicas y genotípicas del rs2476601 del gen PTPN22 en pacientes con EMB y sujetos sanos. En este caso se cumplía el EHW ($p=0.76$).

PTPN22	Controles	EM bilateral	OR (95% IC)	P	Pc
Genotipo	N=348 (%)	N=52 (%)			
TT	1 (0.3)	0
TC	41 (11.8)	12 (23.1)	2.25 (1.09-4.62)	0.04*	NS
CC	306 (87.9)	40 (76.9)	0.46 (0.22-0.94)	0.05*	NS
Alelo	2n=696 (%)	2n=104 (%)			
T	43 (6.2)	12 (11.5)	1.98 (1.01-3.89)	0.06	NS
C	653 (93.8)	92 (88.5)	

Tabla 24: Frecuencia alélica y genotípica del gen PTPN22. (*valor de p sin corregir; OR: Odds ratio; IC: intervalos de confianza) en un primer estudio con un número de individuos menor).

El genotipo TC fue observado en una frecuencia mayor en los pacientes que en los controles ($p=0,04$; $OR=2,25$ [95% IC, 1,09-4,62], mientras que el genotipo CC fue menos frecuente en los pacientes que en los controles ($p=0,05$; $OR=0,46$ [95% IC, 0,22-0,94]), y el genotipo TT no fue observado. No se encontraron diferencias significativas ni para los alelos ni para los genotipos del rs2476601. Después, estudiamos la asociación de ambos polimorfismos con las distintas variables clínicas obtenidas. Sin embargo, no encontramos asociación con ninguna de las variables estudiadas (todas las $p>0,05$).

Este estudio, debido al número pequeño de pacientes con el que fue analizado inicialmente y al desequilibrio observado en el análisis de HW para el CTLA4, fue repetido posteriormente cuando conseguimos un mayor número de muestras de pacientes ($n=131$). Ahora, para el CTLA4 el estudio respetaba el EHW ($p=0.43$) y ningún alelo o genotipo mostró diferencias significativas al ser comparadas entre casos y controles (*tabla 25*).

CTLA4	Controles	EM bilateral	OR (IC 95%)	P
Genotipo	N=1209 (%)	N=131 (%)		
AA	600 (49.6)	69 (52.7)	1.13 (0.79-1.62)	0.51
AG	495 (40.9)	46 (35.1)	0.78 (0.54-1.14)	0.20
GG	93 (7.7)	15 (11.5)	1.55 (0.87-2.77)	0.13
Alelo	2n=2376 (%)	2n=260 (%)		
A	1695 (71.3)	184 (70.8)	0.97 (0.73-1.29)	0.85
G	681 (28.7)	76 (29.2)		

Tabla 25: Frecuencia alélica y genotípica del gen CTLA4 entre los pacientes con EM bilateral y los controles sanos (OR: Odds ratio; IC: intervalos de confianza) en un segundo estudio con un mayor número de individuos (n de EM bilateral=131).

En este caso, al analizar la evolución de síntomas como la hipoacusia o el vértigo recurrente para los pacientes bilaterales, tampoco se observaron diferencias entre la asociación de los distintos alelos del polimorfismo del gen CTLA4 con la evolución de la hipoacusia ($p=0.76$) o del vértigo ($p=0.607$) en la enfermedad (*fig 23*).

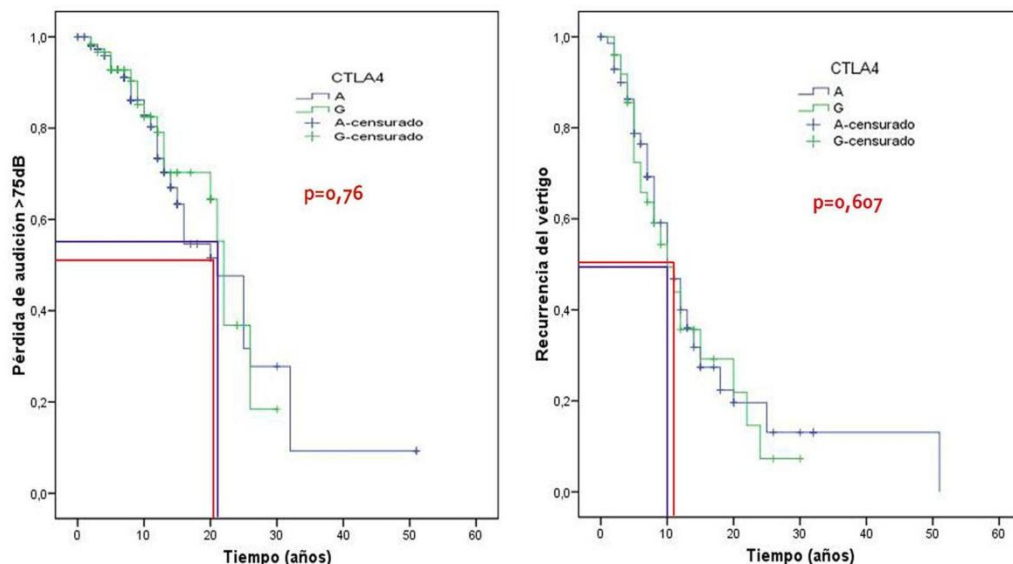


Fig. 23: Representación de la evolución de la hipoacusia y el vértigo recurrente en el gen CTLA4. A la izda. se representa la evolución de la pérdida de audición en los pacientes portadores del alelo A o G ($p=0.76$). A la dcha. se representa la evolución del vértigo recurrente en los pacientes portadores del alelo A o G ($p=0.607$).

Con el gen PTPN22, nos dispusimos a replicar también este estudio con un mayor número de pacientes (*tabla 26*). En esta ocasión, la población seguía cumpliendo el EHW ($p=0.61$).

No se encontraron diferencias en esta ocasión entre los pacientes bilaterales y los controles, a diferencia de lo que habíamos obtenido en los resultados preliminares anteriormente.

PTPN22	Controles	EM bilateral	OR (95% IC)	P
Genotipo	N=1209 (%)	N=131 (%)		
TT	4 (0.3)	2 (1.5)	4.42 (0.80-24.36)	0.12
TC	144 (12.6)	13 (9.9)	0.76 (0.42-1.39)	0.38
CC	988 (86.4)	116 (88.5)	1.22 (0.69-2.15)	0.49
Alelo	2n=2272 (%)	2n=262 (%)		
T	152 (6.7)	17 (6.5)	0.97 (0.58-1.62)	0.90
C	2120 (93.8)	245 (93.5)		

Tabla 26: Frecuencia alélica y genotípica del gen PTPN22 entre los pacientes con EM bilateral y los controles sanos (n de EM bilateral=131; valor de p sin corregir (p=0.15).). (OR: Odds ratio; IC: intervalos de confianza)

Al analizar el efecto del rs2476601 del gen PTPN22 en la evolución de la enfermedad, no se descubrió ninguna diferencia entre los pacientes con EM bilateral que portaban un alelo A o G (p=0.15 para la hipoacusia; p=0.075 para los episodios de vértigo recurrente, *fig. 24*).

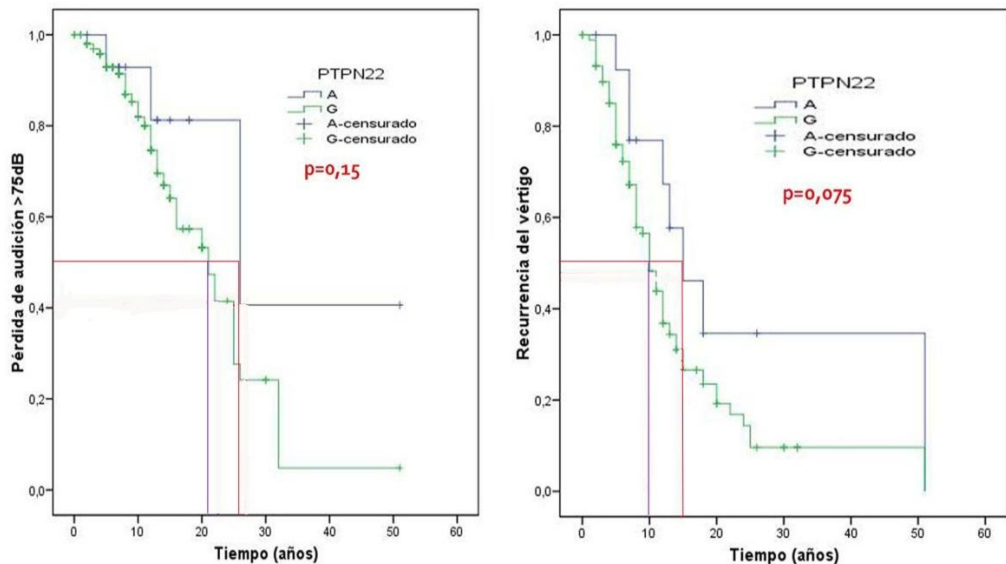


Fig. 24: Curvas de Kaplan-Meier para comprobar la evolución de la hipoacusia y la persistencia del vértigo en pacientes portadores de A/G en el rs2476601 el gen PTPN22.

4. DISCUSIÓN.

En este capítulo se ha planteado el estudio inmunogenético de la EM para intentar localizar marcadores genéticos asociados a la enfermedad.

Los estudios de genes candidatos que siguen un patrón de caso-control como es nuestro caso son, a menudo, el primer paso en la identificación de rutas metabólicas o bioquímicas potenciales en una enfermedad y esta es la primera vez que se realiza un estudio de asociación de genes candidatos del sistema inmune en la EM con suficiente tamaño muestras y varias cohortes de replicación.

Son varios trabajos los que han demostrado que, dentro de un mismo individuo o dentro de la misma familia, suelen coexistir varias EAs lo que lleva a suponer la existencia de factores genéticos comunes (fig. 25) (76). En el capítulo anterior, ya comprobamos una prevalencia mayor de EAs en la EM.

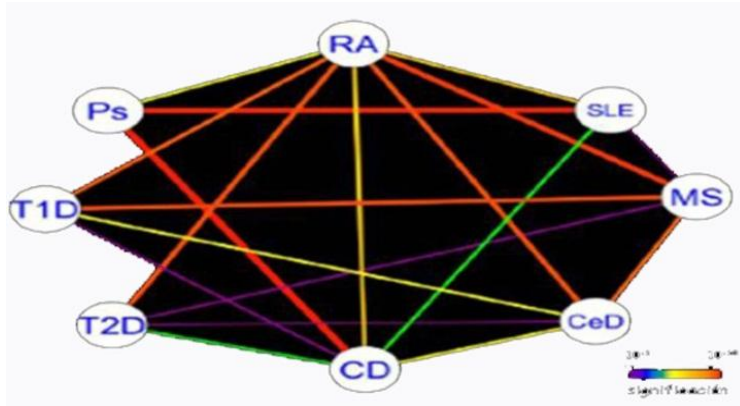


Fig. 25: Relación entre las diferentes enfermedades autoinmunes. Los colores hacen referencia al valor de p del test de la χ^2 para comprobar los genes que comparten entre sí. Los valores de la p comprenden entre 10^{-22} (rojo) a 10^{-2} (azul). Foto adaptada de (76). (RA: Artritis reumatoide; SLE: Lupus eritematoso sistémico; MS: Esclerosis múltiple; CeD: Síndrome de Camurati-Engelmann; CD: Enfermedad celiaca; T2D: Diabetes tipo 2; T1D: Diabetes tipo 1; Ps: Psoriasis).

Un reciente trabajo de revisión de GWAS realizados en diferentes EAs sugiere que la mayoría de las EAs comparten genes de susceptibilidad y la diferencia entre estas enfermedades reside en la contribución de cada gen a cada enfermedad (76). En la siguiente figura (fig. 26) se observa la fuerte asociación que existe entre los genes asociados a la región MHC,

sobre todo para enfermedades como AR y DT1 pero también en el caso de LES y las demás.

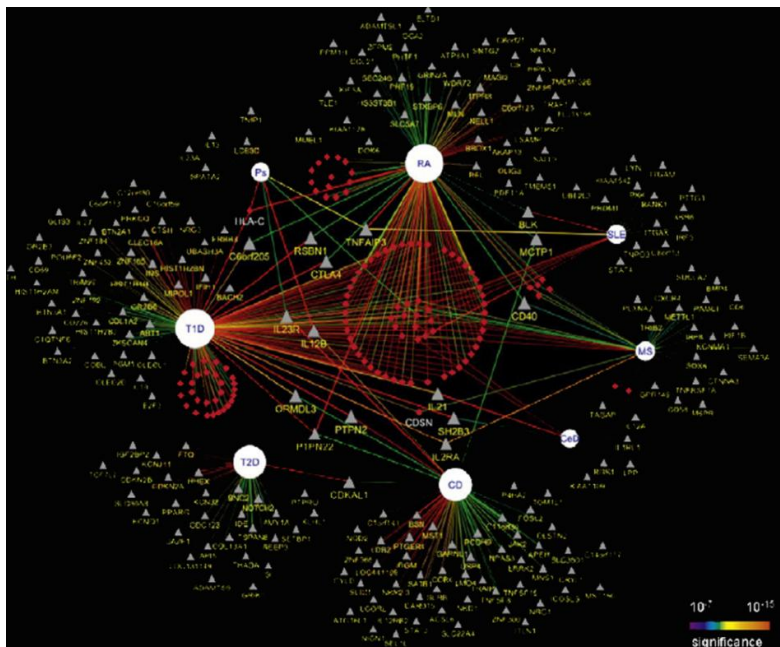


Fig. 26: Genes compartidos por las diferentes EAs. Los genes de la región MHC aparecen representados por diamantes rojos y los genes que no pertenecen a la región MHC por triángulos grises. Las líneas rojas representan una significación más alta y las líneas verdes, significación menos elevadas.

Las únicas dos enfermedades que no mostraron asociación con la región MHC fueron la enfermedad de Crohn y DT2. En relación a los genes que no pertenecían a la región MHC, 16 de ellos fueron compartidos por más de una EAs con un nivel de significación de $p < 10^{-7}$. Entre los genes más fuertemente compartidos se encuentran el PTPN22, el TNFA y el CTLA4 [\(76\)](#).

El hecho de que las EAs compartan asociación con polimorfismos de algunos genes, y sobre todo con los genes HLA, ha sido el fundamento

de nuestro proyecto y nos dirigió a buscar si alguno de estos factores genéticos comunes y asociados anteriormente a varias EAs también presentaba asociación con la EM.

Otros genes como MIF, INFG y NOS2A fueron propuestos por su asociación individual con EAs [\(77-80, 28, 81-83, 55\)](#) y por estar involucrados en la producción de NO, responsable de la apoptosis de las NGEs en el modelo animal de hidrops endolinfático [\(84\)](#).

Ninguno de los polimorfismos de los genes estudiados, ni ningún alelo HLA presentaron resultados significativos de asociación con la EM.

En el caso del INFG, un estudio de pacientes con uveítis en Japón tampoco encontró diferencias alélicas ni genotípicas entre pacientes y controles [\(85\)](#).

En el estudio del gen MIF, el alelo CATT₅ mostró diferencias, pero las diferencias encontradas inicialmente no pudieron ser replicadas ni confirmadas. Uno de los motivos para estudiar este gen fue su potencial para convertirse en una buena diana terapéutica ya que la posible terapia anti-MIF podría ser efectiva para pacientes que no responden bien a glucocorticoides como tratamiento para la EM. Los glucocorticoides son capaces de inducir la expresión de MIF y éste es capaz de inhibir el efecto del tratamiento y hacer que éste no sea tan efectivo. *In vivo*, se ha visto que la deficiencia de MIF o su neutralización producía una mejora

de las enfermedades inflamatorias en el contexto de que la reducción de MIF era asociado con una reducida producción de TNF α e IL-1 [\(86\)](#).

Nuestro estudio del HLA incluyó 101 pacientes con EM (la muestra se aumentó a 302 pacientes para el gen HLA-B), y sin embargo, no ha conseguido establecer relación entre ninguna de las variantes alélicas estudiadas y la enfermedad.

Nosotros investigamos también por primera vez la asociación de la variante +49A/G CTLA4 y la asociación con la EM, y no se encontraron diferencias en la distribución alélica o genotípica. Nuestros datos se asemejan más a los resultados de ausencia de asociación observada con otras EAs órgano-específicas como vitiligo [\(87\)](#) y la EII [\(88\)](#).

El SNP del PTPN22 se estudió por su efecto funcional de la variación -1858 en la unión del LYP a Csk [\(70\)](#), sugiriendo que la asociación de este polimorfismo con la autoinmunidad puede ser debida al papel de PTPN22 en la regulación de las células T. En esta variante alélica se ha observado un gradiente norte-sur en Europa en el alelo T observándose una frecuencia que varia desde el 7% en España hasta el 16% en Finlandia [\(89\)](#). Nuestra frecuencia alélica del alelo T fue de 6,7% en los controles, lo que confirma las frecuencias observadas en los estudios previos para la población española.

Para el gen MICA, encontramos una distribución diferente en el alelo MICA-A.5 entre los pacientes y controles de la población de la cohorte 2

(Almería, Granada, Valencia y Salamanca). El alelo MICA-A.5 se encontraba en menor proporción en los pacientes de esta cohorte que en sus respectivos controles. Pero la asociación con esta variante tampoco pudo ser replicada. El alelo más frecuente en nuestra población fue el MICA-A.6, seguido de los alelos MICA-A.5.1, A.4, A.5 y, finalmente, A.9. Estas distribuciones fueron semejantes a las encontradas en otros trabajos realizados para la misma población [\(90\)](#).

Es interesante que las repeticiones A.7 y A.8 no se encuentren de forma habitual en las poblaciones sugiriendo que, por alguna razón, estas repeticiones deben ser deletéreas. Aunque algunos trabajos sí han visto estas variantes, aunque en proporciones muy pequeñas [\(91\)](#). El tándem de 10 repeticiones de este microsatélite (GCT)₁₀ denominado MICA-A.10 [\(92\)](#) se ha descrito en otros trabajos, pero esta variante no se encontró en nuestra población.

Ninguna de las repeticiones del gen MICA aparecía asociada a la EM en nuestro estudio, pero cuando analizamos la evolución de dos de los síntomas de la enfermedad, la hipoacusia y el vértigo, estos sí presentaron una asociación con la repetición MICA-A.4.

Los pacientes con MICA-A.4 tardaban 6 años más en alcanzar una hipoacusia >40dB (estadio 3) que los demás pacientes. Al mismo tiempo, los pacientes portadores de este alelo presentaban crisis de vértigo recurrente durante una mediana de 15 años, cuatro años más que los pacientes que no portaban el alelo. En conclusión, los pacientes

portadores del alelo MICA-A.4 tendrían la audición más conservada aunque los episodios de vértigo fuesen más prolongados en el tiempo, sintomatología que se comparte en una tipología de una enfermedad menos severa.

Si recordamos, el alelo MICA-A.4 presentó un fuerte LD con el alelo HLA-B*18 y HLA-B*27, con $D > 0,7$ (MICA-A.4-B*18, $D' = 0,906$ y MICA-A.4-HLA-B*27, $D' = 1,000$ en la población control y para la población de casos, $D' = 0,829$ y $D' = 0,864$, respectivamente). El haplotipo HLA-B*18-MICA-A.4 también fue uno de los haplotipos más frecuentes encontrado en una población de 133 individuos sanos italianos previamente tipados [\(93\)](#).

El siguiente paso, por tanto, fue intentar confirmar si la asociación encontrada del alelo MICA-A.4 con la progresión más lenta de la hipoacusia era debida realmente a una asociación entre MICA y la EM, o si por lo contrario, se debía a una asociación enmascarada por el LD observado entre el alelo MICA-A.4-HLA-B*18. Para esto, se realizó un análisis de Kaplan-Meier usando el test de logaritmo de rango únicamente el pacientes portadores del alelo HLA-B*18 y no se encontraron diferencias, por lo que podíamos confirmar que la asociación entre la repetición MICA-A.4 y la EM era independiente de HLA.

Las repeticiones MICA-A.4 y MICA-A.9 muestran una Metionina (M) en el codón 129 del dominio α_2 de la proteína, mientras que el alelo MICA-A.5 siempre codifica para una Valina (V) en esta misma posición. Se ha demostrado que MICA V129 está asociado con una reducida afinidad por su receptor NKG2D mientras que M129 produce una menor expresión de NKG2D en las células efectoras, reduciendo la respuesta de las células NK y CD8+ *in vivo* [\(94\)](#). Esta disminución de la expresión podría ser controlada directamente aumentando la afinidad de unión entre MICA-NKG2D.

Por tanto, MICA-A.4 da lugar a M129, que acabaría provocando una unión de alta afinidad a NKG2D. Esa unión produce una regulación decreciente de los receptores NKG2D y también de la propia molécula MICA, y se acaba reduciendo la respuesta de las células NK y CD8+ [\(95\)](#). De ese modo, una baja actividad o menor respuesta de las células NK y CD8+ se traduce en una menor respuesta autoinmune, lo que conduciría a una progresión más lenta de la enfermedad, como vemos que ocurre en los pacientes que portan MICA-A.4.

La expresión de la proteína MICA en el hueso temporal del oído interno no ha sido investigada y no se conoce aún qué células pueden expresar MICA en pacientes con HE. Así, resulta difícil estudiar si el receptor MICA es inducido en el saco endolinfático debido a la inflamación ya que esto supone algunos problemas debido a que es imposible, por razones éticas, acceder al órgano diana que es el oído interno.

Este trabajo ha constituido el primer estudio que ha intentado conocer la implicación del gen MICA en la EM y se ha conseguido relacionar la repetición MICA-A.4 con una progresión más lenta de la enfermedad.

La importancia de MICA-A.4 en la EM es de carácter pronóstico lo que mejorará el diagnóstico y la clasificación de los pacientes que sufren hipoacusia o que sufren EM. Este hallazgo nos hace disponer de un marcador biológico que facilita la toma de decisiones sobre el tratamiento y el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

En el capítulo anterior se demostró que las poblaciones linfocitarias no presentan diferencias entre nuestros pacientes y nuestros controles pero, al igual que ocurre con MICA, sí se apreció una relación de estas poblaciones con la progresión de la hipoacusia y del vértigo.

En conclusión, la EM no cumpliría el esquema autoinmune típico de una EA propuesto al inicio de esta tesis, al no encontrarse asociación con ninguna variante conocida previamente asociada a autoinmunidad. La posible respuesta inmunológica presente en la EM tiene que diferenciarse de las EAs clásicas. Posiblemente la enfermedad se desencadene como una respuesta autoinmune, pero luego se verían implicados otros procesos que acabarían provocando el hidrops endolinfático y la apoptosis de neuronas cocleares. Una señal de daño sería enviada a la cóclea que desencadenaría la respuesta de MICA, aunque la expresión de MICA a nivel de la cóclea está aún sin confirmar. Por tanto, MICA sería el encargado de desencadenar la respuesta

inmunológica al inicio de la enfermedad, pero luego se deben ver implicados otros procesos en el oído interno que conducen al hidrops.

Hay que tener en cuenta algunas limitaciones que podrían estar afectando a nuestros resultados de asociación. La EM es clínica y genéticamente heterogénea y los criterios clínicos por los cuales los pacientes son diagnosticados posiblemente no sean suficientes para diferenciar las variantes clínicas de una enfermedad compleja. Otro de los factores a mejorar de estos estudios es el tamaño de muestra necesario para encontrar resultados concluyentes. Cuando calculamos el poder estadístico de los estudios con HLA descubrimos que es necesario mayor número muestral, por lo que nuestro esfuerzo debe concentrarse en conseguir más pacientes.

El poder estadístico del estudio está en un 24%. Para alcanzar un poder estadístico del 80% sería necesario conseguir mínimo 1515 pacientes con EM. La EM no es una enfermedad común, y la obtención de un gran número de pacientes fenotípicamente homogéneos no es sencilla, a lo que se suma la inclusión de factores de confusión, con sesgos de selección, puesto que algunos pacientes con vértigo recurrente e hipoacusia debida a otra causa podrían ser diagnosticados de EM.

5. BIBLIOGRAFIA.

1. http://www.aarda.org/research_display.php?ID=47
2. Beikert VP. Zur Frage der Empfindungs schwerhörigkeit und der Autoallergie. *Laryngol Rhinol Oto* 1961;40:837-42.
3. Tomiyama S. Development of endolymphatic hidrops following immune response in the endolymphatic sac of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 1992;112:470-8.
4. Leone CA, Feghali JG, Linthicum F.H. Endolymphatic sac: posible role in autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984;93:208-9.
5. Takahashi M, Harris JP. Analysis of immunocompetents cells following inner ear immunostimulation. *Laryngoscope* 1988;98:1133-8.
6. Altermatt HJ, Gebbers JO, Muller C *et al.* Human endolymphatic sac: evidence for a role in inner ear immune defence. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1990;52(3):143-8.
7. Kim SH, Kim JY, Choi J-Y *et al.* Proteomic analysis of human endolymphatic sac fluid in Meniere's disease: pilot study for biomarkers of Meniere's disease. *8th Barany Society. Meeting in Uppsala*, June 10-13, 2012.
8. Ramirez Camacho R, García Berrocal JR. Laberintopatías autoinmunes. En: Bartual J, Perez Fernandez N, editores. *El sistema vestibular y sus alteraciones*. Patología. TomoII. Barcelona: Masson, 1999;28:78-88.
9. Di Rosa F., Barnaba V. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol. Rev.* 1998;164:17-27.
10. En Murphy, Kenneth P. (2012) Janeway's immunobiology. Galard Science, Taylor & Francis Group, LLC.

11. Douglas TF. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50–54.
12. Chambers BJ, Salcedo M, Ljunggren HG. Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* 1996;5:311–317.
13. Tincani A, Andreoli L, Bazzani C *et al.* Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 2007;7(1):1-7.
14. Shi FD, Takeda K, Akira S *et al.* Interleukin-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of interferon- γ by natural killer cells. *J. Immunol* 2000; 165(6): 3099–140.
15. Bachmann MF, Kopf M. On the role of the innate immunity in autoimmune disease. *J Exp Med* 2001;193(12):47-50.
16. Caillat-Zucman S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum. Immunol.* 2006;67:204-7.
17. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC *et al.* NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 2006;291(2):222-31.
18. Joyce MG, Sun PD. The structural basis of ligand recognition by natural killer cell receptors. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;203628.
19. Bauer S, Groh V, Wu J *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-29.
20. Shi FD, Zhou Q. Natural killer cells as indispensable players and therapeutic targets in autoimmunity. *Autoimmunity* 2011;44(1):3-10.
21. Braham S, Bresnahan M, Geraghty DE *et al.* A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 1994:6259-6263.

22. Schrambach S, Arduzzone M, Leymarie V *et al.* In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *Plos One* 2007;2(6): 518.
23. Mizuki N, Ota M, Kimura M *et al.* Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:1298-303.
24. Perez-Rodriguez M, Corell A, Arguello JR *et al.* A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 2000;55:162-65.
25. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3(10):791-800.
26. Renner P, Roger T, Calandra T. Macrophage migration inhibitor factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2005;41:513-9.
27. Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics* 1994;19(1):48-51.
28. Martinez A, Orozco G, Varade J *et al.* Macrophage migration inhibitory factor gene: influence on rheumatoid arthritis susceptibility. *Hum. Immunol.* 2007;68:744-747.
29. Sanchez E., Gomez LM, Lopez-Nevot MA *et al.* Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2006;7:433-36.
30. Donn R., Alourfi Z., De Benedetti F. *et al.* Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2402-9.
31. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T *et al.* Interferon-gamma : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75(2):163-89.

32. Boehm U, Klamp T, Groot M *et al.* Cellular responses to interferón- γ . *Ann. Rev. Immunol.* 1997;15:749-95.
33. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shows TB *et al.* Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* 1983;157(3):1020-7.
34. Gray PW, Goeddel DV. Human immune interferon (IFN-gamma) gene sequence and structure. *Basic Life Sci.* 1983;25:35-61.
35. Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D *et al.* Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000;356:820-25.
36. Rueda B., Martinez A., Lopez-Nevot MA *et al.* A functional variant of IFN-gamma gene is associated with coeliac disease. *Genes Immun.* 2004;5(6):517-9.
37. Tegoshi H, Hasegawa G, Obayashi H. *et al.* Pòlymorphisms of interferón-gamma gene CA repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type I diabetes. *Human Immunol.* 2002;63(2):121-128.
38. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83:8699-8702.
39. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L. *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:3195-3199.
40. Sullivan K.E., Wooten C., Schmeckpeper B.J. *et al.* A promoter polymorphism of tumour necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2207-11.
41. Ramagopalan S.V., Deluca G.C., Degenhardt A. *et al.* The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2008;202:183-99.
42. Juran BD, Atkinson EJ, Larson JJ *et al.* Carriage of a tumor necrosis factor polymorphism amplifies the cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4 attributed risk of primary biliary cirrhosis: evidende for a gene-gene interaction. *Hepatology* 2010;52:223-9.

43. Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 2002;123(1):256-70.
44. Bredt DS. Nitric oxide signaling in brain: potentiating the gain with YC-1. *Mol. Pharmacol.* 2003;63(6):1206-8.
45. Kleinert H, Pautz A, Linker K *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;500:255-66.
46. De Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK *et al.* Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93(3):1054-9.
47. Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR *et al.* Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.* 1992;176(1):261-4.
48. Marsden PA, Heng HH, Duff CL *et al.* Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 1994;19(1):183-5.
49. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP *et al.* Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 1994;269(9):6765-72.
50. Warpeha KM, Xu W, Liu L *et al.* Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J.* 1999; 13(3):1825-32.
51. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sánchez E *et al.* Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(9):1182-5.
52. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol* 2001;2:907-916.

53. Kun JF, Mordmuller B, Lell B *et al.* Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 1998;351:265-66.
54. Xu W, Liu L, Emson P *et al.* The CCTTT polymorphism in the NOS2A gene is associated with dementia with Lewy bodies. *Neuroreport* 2000;11(2):297-9.
55. Motallebipour M, Rada-Iglesias A, Jansson M *et al.* The promoter of inducible nitric oxide synthase implicated in glaucoma based on genetic analysis and nuclear factor binding. *Mol Vis* 2005;4(11):950-7.
56. Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport (2012). Autoimmunity and transplantation. En: Murphy, Kenneth P. (eds.). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. p.626-637.
57. Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:75-79.
58. Lie BA, Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 2005;17(5):526-31.
59. Raffel LJ, Rotter JI. "Type 1 Diabetes Mellitus". En: *The Genetic Basis of Common Diseases*. 2002. King RA, Rotter AG, Motulsky (Eds), Oxford University Press.
60. Tivol EA, Borjello F, Schweitzer AN *et al.* Loss of CTLA4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA4. *Immunity* 1995;3:541-47.
61. Ueda H, Howson JM, Esposito L *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506-511.
62. Donner H, Rau H, Walfish PG *et al.* CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:143-146.

63. Nithiyanthan R, Heeard JM, Allahabadia A *et al.* Polymorphism of the CTLA4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid* 2002;12:3-6.
64. Zhu G, Agusti A, Gulsvik A *et al.* CTLA4 gene polymorphisms are associated with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 2009;34(3):598-604.
65. Donner H, Rau H, Walfish PG *et al.* CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:143-146.
66. Anjos S, Nguyen A, Ounjssi-Benkhalha H *et al.* A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 result in inefficient glycosilation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 2002;277(48):46478-86.
67. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A *et al.* A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1+49) alters T cell activation). *Immunogenetics* 2002;54(1):1-8.
68. Mustelin T, Alonso A, Bottini N *et al.* Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol Immunol* 2004;41:687-700.
69. Siminovich KA. PTPN22 and autoimmunity disease. *Nat Genet* 2004;36:1248-49.
70. Bottini N, Musumeci L, Alonso A *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337-338.
71. Begovich AB, Carlton VEH, Honingberg LA *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330-337.
72. Vang T, Liu WH, Delacroix L *et al.* LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CsK. *Nat Chem Biol* 2012;8(5):437-46.
73. Bottini N, Vang T, Cucca F, Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin. Immunol.* 2006;18(4):207-13.

74. Juneblad K, Johansson M, Rantapaa-Dahlgvist S *et al.* Association between the PTPN22 +1858 C/T polymorphism and psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13(2):R45.
75. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181-185.
76. Baranzini SE. The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective. *Curr Opin Immunol* 2009;21:596-605.
77. Delgado-Vega A, Sánchez E, Lofgren S. Recent finding on genetics of systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2010;22(6):698-705.
78. Rosloniec EF, Latham K, Guedez YB. Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity. *Arthritis Res* 2002;4(6):333-6.
79. Qureshi AA, Tan X, Reis JC. Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of Young and senescent mice by δ -tocotrienol and quercetin. *Lipids Health Dis* 2011;10:239.
80. Pravica V, Asderakis A, Perrey C. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999 26(1):1-3.
81. Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC *et al.* A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2002;3: 170-176.
82. Barton A, Lamb R, Symmons D. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphism is associated with susceptibility to but not severity of inflammatory polyarthritis. *Genes Immun* 2003;4(7):487-91.
83. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sánchez E *et al.* Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(9):1182-5.
84. Moon IJ, Kim KR, Chu HS. N-acetylcysteine and N-nitroarginine methyl ester attenuate Carboplatin-induced ototoxicity in dissociated spiral ganglion neuron cultures. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2011 4(1):11-7.

85. Horie y, Kitaichi N, Takemoto Y. Polymorphism of IFN-gamma gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Mol Vis* 2007;13:2334-8.
86. Aringer M, Smolen JS. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2008;10(1):202.
87. LaBerge GS, Bennett DC, Fain PR *et al.* PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. *J Invest Dermatol* 2008;128:1757-62.
88. Rueda B, Zhernkova A, López-Nevot MA *et al.* CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005;66:321-325.
89. Gregersen PK, Lee HS, Batliwalla F *et al.* PTPN22: setting thresholds for autoimmunity. *Semin Immunol* 2006;18(4):214-23.
90. Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N *et al.* Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue antigens* 1997;49(5):448-58.
91. Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA *et al.* A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. *Tissue Antigens* 2002;60(6):526-8.
92. Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* 2010;16(3):97-106.
93. Bolognesi E, Dalfonso S, Rolando V *et al.* MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *Eur J. Immunogenetics* 2001;28(5):523-30.
94. Steinle A, Li P, Morris DL *et al.* Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001;53:279-87.
95. Kopp R, Glas J, Lau-Werner U *et al.* Association of MICA-TM and MICB C1_2_A Microsatellite Polymorphisms with Tumor Progression in Patients with Colorectal Cancer. *J Clin Immunol* 2009;29:545-554.

Conclusiones

1. La EM presenta una **fuerte agregación familiar** en nuestra población. Mostrando una frecuencia de hermanos enfermos del 4,3% y una frecuencia de familiares de cualquier grado también enfermos del 9,14%.
2. La **prevalencia de AR, LES y Espondilitis Anquilosante es más elevada** en la EM que en la población normal. Esta prevalencia no difiere entre los pacientes unilaterales y los bilaterales, aunque estas enfermedades sí fueron más frecuentes en los pacientes con migraña.
3. Las variantes genéticas estudiadas en el gen MICA no están asociadas al padecimiento de la enfermedad. Sin embargo, la repetición **MICA*A.4 provoca una evolución más lenta en la hipoacusia** en los pacientes portadores de esta repetición.
4. El STR del **gen MIF (CATT₅₋₈)**, del gen **INFG (CA₁₁₋₁₈)**, del gen **NOS2A (CCTTT₉₋₁₆)** y el rs1800629 del gen **TNFA no juegan un papel relevante** en la genética de la EM.
5. **Ninguna de las variantes** de los genes **HLA** se encontraba **asociada** con la EM en nuestro estudio.
6. Los polimorfismos rs231775 y rs2476601 de los genes **CTLA4 y PTPN22 no están asociados** a la EM.

Perspectivas futuras

En la EM, la mayoría de los genes que contribuyen a la enfermedad están aún sin descubrir. En este trabajo hemos podido asociar a la enfermedad al gen MICA, que modifica la evolución de la hipoacusia.

Una de las mayores limitaciones de los estudios de asociación genética en la EM viene determinada por la difícil tarea de conseguir un elevado número de pacientes y así como el bajo número de variantes alélicas que se pueden analizar en cada estudio de asociación genética.

Las técnicas que, a diferencia de los estudios de asociación genética, permiten analizar decenas de miles de variantes simultáneamente son de gran utilidad para la identificación de genes de susceptibilidad en las enfermedades complejas. Así, un GWAS que permite analizar millones de polimorfismos en un único estudio, supone una gran ventaja para la identificación de variantes comunes. Aun así, cuentan con algunas limitaciones como la necesidad de reunir miles de pacientes para su estudio, así como la dificultad para identificar variantes alélicas raras.

Sin duda, un método que permite analizar variantes comunes y raras de todos los genes y que no presenta las limitaciones descritas viene presentada por la nueva generación de tecnologías de secuenciación. Aún no hemos llegado al momento en el que secuenciar un genoma sea algo rutinario, aunque los costes se van reduciendo progresivamente. Sin

embargo, podemos analizar parte de este genoma, el exoma (parte del genoma formado por los exones, es decir, las partes codificantes de los genes que darán lugar a las proteínas). Todo esto, sumado a una infraestructura bioinformática compleja nos aporta un gran potencial de diagnóstico.

Estas técnicas permiten identificar todas las variantes alélicas en miles de genes candidatos, después de analizar casos y controles, debido a la variabilidad y complejidad genética tan alta en las enfermedades complejas. El análisis bioinformático es complejo y se requiere de métodos de priorización, como por ejemplo, elegir genes que funcionalmente estén relacionados y que al mismo tiempo guarden una asociación con la presencia de la enfermedad.

Esto abre las puertas a la Medicina Genómica, en la que nos encontramos en la fase I de generación de información clínica pero en el futuro se podrá sintetizar una práctica clínica basada en esta información.

High Prevalence of Systemic Autoimmune Diseases in Patients with Menière's Disease

Irene Gazquez¹, Andres Soto-Varela², Ismael Aran³, Sofia Santos², Angel Batuecas⁴, Gabriel Trinidad⁵, Herminio Perez-Garrigues⁶, Carlos Gonzalez-Oller⁷, Lourdes Acosta⁷, Jose A. Lopez-Escamez^{1,8*}

1 Genyo, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía, Granada, Spain, **2** Division Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, **3** Department of Otolaryngology, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, Spain, **4** Department Otolaryngology, Hospital Universitario Salamanca, Salamanca, Spain, **5** Department Otolaryngology, Hospital Universitario de Badajoz, Badajoz, Spain, **6** Division Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital La Fe, Valencia, Spain, **7** Otolaryngology & Neurotology Group, CTS495, Department of Biotechnology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain, **8** Otolaryngology & Neurotology Group, CTS495, Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain

Abstract

Background: Autoimmunity appears to be associated with the pathophysiology of Meniere's disease (MD), an inner ear disorder characterized by episodes of vertigo associated with hearing loss and tinnitus. However, the prevalence of autoimmune diseases (AD) in patients with MD has not been studied in individuals with uni or bilateral sensorineural hearing loss (SNHL).

Methods and Findings: We estimated the prevalence of AD in 690 outpatients with MD with uni or bilateral SNHL from otoneurology clinics at six tertiary referral hospitals by using clinical criteria and an immune panel (lymphocyte populations, antinuclear antibodies, C3, C4 and proinflammatory cytokines TNF α , INF γ). The observed prevalence of rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE) and ankylosing spondylitis (AS) was higher than expected for the general population (1.39 for RA, 0.87 for SLE and 0.70 for AS, respectively). Systemic AD were more frequently observed in patients with MD and diagnostic criteria for migraine than cases with MD and tension-type headache ($p = 0.007$). There were clinical differences between patients with uni or bilateral SNHL, but no differences were found in the immune profile. Multiple linear regression showed that changes in lymphocytes subpopulations were associated with hearing loss and persistence of vertigo, suggesting a role for the immune response in MD.

Conclusions: Despite some limitations, MD displays an elevated prevalence of systemic AD such as RA, SLE and AS. This finding, which suggests an autoimmune background in a subset of patients with MD, has important implications for the treatment of MD.

Citation: Gazquez I, Soto-Varela A, Aran I, Santos S, Batuecas A, et al. (2011) High Prevalence of Systemic Autoimmune Diseases in Patients with Menière's Disease. PLoS ONE 6(10): e26759. doi:10.1371/journal.pone.0026759

Editor: Robert E. Means, Yale Medical School, United States of America

Received: June 28, 2011; **Accepted:** October 3, 2011; **Published:** October 28, 2011

Copyright: © 2011 Gazquez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by a PI10/00920 Research Project from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant BIO103-SA-51-11 from Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León and EU Regional Development Funds (FEDER). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. JALE had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: antonio.lopezescamez@genyo.es

Introduction

Meniere's disease (MD) is a chronic disorder affecting the inner ear characterized by fluctuating sensorineural hearing loss (SNHL), episodes of vertigo lasting from 20 minutes to hours, tinnitus, and aural fullness [1]. Phenotypic heterogeneity is observed in patients with MD and it is difficult to define the outcome in early stages of the disease. Although the frequency of the attacks of vertigo is usually greater in the first few years of the disease, and it diminished at advances stages of MD [2,3], balance problems persist along the disease and may become severe if patients develop a bilateral vestibular hypofunction.

Hearing loss can be observed in one or both ears. The prevalence of bilaterality is around 25–40%, being dependent upon the follow-up period, and the risk of developing bilateral MD

for a patient with unilateral disease has been estimated 14% [4]. Usually, SNHL starts in one ear and it can appear in the second ear after a mean interval of 7 years (range: 2 months –27 years) [4], and bilateral SNHL has a significant impact in health-related quality of life in MD [5].

Autoimmune mechanisms appear to be associated with the pathophysiology of MD [6,7]. The evidences that support this hypothesis include: the association with alleles of DRB1 gene of the MHC reported in different populations [8,9]; the finding of elevated levels of autoantibodies or circulating immune complexes (CIC) in the serum of some patients [7,10,11]; the experimental induction of hydrops by injection of antigens or monoclonal antibodies in the guinea pig [12] and the association with a functional variant of LYP, a lymphoid protein phosphatase, which inhibits T cell receptors response in patients with bilateral ear

involvement [13]. Different autoantibodies such as antinuclear antibodies (ANA), antiphospholipid antibodies and antibodies against a 68 kD protein have been studied in small series of patients with MD, showing conflicting results [6,7,14–17]. However, the prevalence of autoimmune disease (AD) in patients with MD and the role of lymphocyte subpopulations and cytokines such as TNF α and INF γ has seldom been investigated in patients with MD [17].

The aim of this study is to estimate the prevalence of AD in patients with MD and to evaluate an immune panel among patients with MD and unilateral or bilateral SNHL.

Methods

Subjects

A case series of 690 adult patients (217 bilateral, 473 unilateral disease) with a clinical diagnosis of definite MD according to the diagnostic scale of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (AAO-HNS) were included from October 2007 to May 2011 [18]. We selected patients with bilateral SNHL in a higher percentage than it is observed in most clinics to reach enough number of patients to be compared with unilateral MD. All were outpatients regularly followed up at the Otoneurology Clinics at six tertiary referral centers that recruited patients for this study. The information was obtained by means of a standardized, structured clinical database designed for follow-up in patients with MD [19]. When patients agreed to participate in the study, they were informed that they must provide information about the number and duration of episodes of vertigo, headache and hearing loss they had experienced in the last six months. The interview was oriented to identify the type of headache and if the patient reported symptoms suggesting an autoimmune condition.

All patients underwent complete otolaryngologic examination and audiologic evaluation with pure-tone audiometry and tympanometry. A neurotologic examination including nystagmus in the primary position, gaze-evoked and head-shaking nystagmus and standard bithermal caloric test was also performed. Hearing staging for each patient with definite MD was defined as the mean of four-tone average of 0.5, 1, 2 and 3 kHz according to the AAO-HNS criteria: stage 1, ≤ 25 dB; stage 2, 26–40 dB; stage 3, 41–70 dB; stage 4, > 75 dB [18]. Patients with bilateral SNHL were considered to have metachronic SNHL if a period of time > 1 month to develop SNHL between the first and the second ear was observed. Individuals with simultaneous SNHL in both ears were considered to have synchronic SNHL. Episodes of vertigo were characterized by their frequency and duration as previously described [16], and episodes of vertigo lasting less than 20 minutes

or the sensation of instability usually observed in these patients were not considered in this study. The protocol of diagnosis included an examination by magnetic resonance imaging of the brain to exclude other possible causes of neurotological symptoms.

Ethics

The subject's written informed consent was obtained to participate in the study according to the Helsinki guidelines and the Hospital de Poniente Institutional Review Board approved the study. The clinical features of a subset of 89 patients with MD from Almeria in our series were previously reported [9].

Immunoserological assessment

Antinuclear antibodies (ANA) were detected on Hep-2 cells by indirect immunofluorescence method. Titers of 1/160 were considered positive. We also used a qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of ANAs (DIASTAT). It detects ANAs against Sm, Sm/RNP, Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70, Jo-1, dsDNA histone and centromere antigens. Serum concentrations of extractable nuclear antigens (ENAs) were detected by EliA Symphony (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany), an ENA screening which detects the following autoantibodies: SSA/Ro, SSB/La, U1RNP (A, C), RNP70, Scl-70, JO-1, centromere B and Sm. Also, anti-dsDNA were measured by EliA dsDNA (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany).

Serum complement proteins C3 and C4 and immunoglobulins (IgG, IgM, IgA) were measured by an immunoturbidimetric assay on an Olympus AU5400 analyzer.

A C1q binding ELISA kit (HYCOR, Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands) was used to determine Circulating Immune Complexes (CIC) concentrations in patients with MD in a Hytec 288 Plus System (HYCOR). Values higher than +3 SD of the mean normal cutoff point were considered positive.

Peripheral lymphocyte populations were characterized by an EPICS XL-MLC flow cytometer (Coulter). Fluorescent dyes used were CD3-PC5/CD4-FITC/CD8-PE.

Determination of serum soluble cytokines

Serum interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by an ELISA kit (Biosource TM, Nivelles, Belgium) using an ELISA plate reader (Menarini Diagnostics) according to manufacturer's instructions. The intraassay and interassay coefficients of variation, respectively, were 1.8% and 2.3% for IFN- γ , 0.9% and 1.6% for TNF- α . All analytical determinations were performed in the quiescent phase (at least 4 weeks since the last episode of vertigo).

Table 1. Clinical variables of 690 patients with MD according to the center of origin.

CENTERS	Age [†]	Age of onset [†]	Gender (% women)	Bilateral sensorineural hearing loss	Follow-up period >10 years (%)
Almeria (n = 150)	56.6 \pm 12.6	46.6 \pm 12.6	61.3	42.7	51 (34)
Badajoz (n = 104)	53.4 \pm 13.6	46.3 \pm 15.2	51.0	9.6	33 (32)
Pontevedra (n = 127)	54.4 \pm 12.5	46.3 \pm 12.4	71.7	30.7	40 (31)
Salamanca (n = 99)	53.9 \pm 12.5	45.9 \pm 12.3	60.6	47.5	29 (29)
Santiago (n = 155)	54.0 \pm 13.8	45.5 \pm 14.4	54.2	41.9	55 (35)
Valencia (n = 55)	59.4 \pm 13.5	44.1 \pm 15.1	41.8	41.9	36 (65)
P value	0.042	0.884	0.001	2.1×10^{-8}	

[†]Mean \pm Standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0026759.t001

Main outcome measurements

The clinical records of all patients were reviewed to retrieve additional information not included in the clinical database. Some patients were visited several times to obtain all clinical and analytical variables of the protocol. The following variables were assessed: sociodemographics (sex, age), clinical (age of onset, uni/bilateral disease, ear affected, hearing loss at diagnosis, AAO-HNS hearing stage, class (frequency of vertigo during the last six months), Tumarkin crisis and functional scale, duration of attacks, time-course of the disease, time since last attack) and associated factors (headache, type of headache, history of AD, smoking and coffee drinking). Diagnosis of AD was performed by a rheumatologist or Internal Medicine specialist, according to the criteria defined by the American College of Rheumatology (<http://mail3.rheumatology.org/practice/index.asp>). Diagnosis of migraine and tension-type headache was performed according to the International Classification of Headache Disorders [20].

Exclusion criteria

We excluded patients with vestibular migraine, benign paroxysmal positional vertigo, vestibular neuritis, head trauma, ear surgery, recurrent infection of the middle ear, acoustic schwannoma and any known cause mimicking MD, according to the diagnostic scale of the AAO-HNS [18].

Statistical analysis

Data are shown as means with standard deviations (SD). Qualitative variables were compared between unilateral and bilateral MD by using Pearson Chi-square with Yates' continuum correction; Fisher's test was calculated when the number of cases per cell was <5 . Quantitative variables (age, time-course and time since last attack) were compared by unpaired student's T test. The time-course of hearing stage, episodes of vertigo and Tumarkin crisis were determined according to the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the log-rank test.

Bivariate regression analysis was used to search for association between clinical and analytical factors and hearing loss and frequency of vertigo. Using pure tone average hearing loss and the frequency of vertigo in the last six months as dependent variables, we carried out several multiple linear regression models (forward method) to investigate the factors associated with hearing loss and the frequency of vertigo in patients with MD. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Clinical differences in patients with uni and bilateral SNHL

The patients in this series showed no differences in age at inclusion or the age of onset of disease (Table 1). However, the percentage of women included in each center was different (range 42–72, $p = 0.001$). Moreover, although the percentage of patients with bilateral SNHL was different in each center (range 10–47, $p = 2.1 \times 10^{-8}$), they do not represent the real percentage of uni or bilateral MD observed in each clinics.

We compared the clinical phenotype in patients with unilateral and bilateral SNHL with at least 5 years since the onset of symptoms ($n = 466$, Table 2). Hearing loss at diagnosis was significantly worse in patients with bilateral SNHL when they were compared with unilateral MD ($p = 2.9 \times 10^{-6}$). Migraine was not found more common in patients with uni or bilateral SNHL ($p = 0.88$). In addition, no differences were found in the frequency of reported rheumatic diseases, smoking or coffee consumption between patients with unilateral or bilateral SNHL. Hearing stage

and functional level were worst in individuals with bilateral hearing loss ($p = 5.2 \times 10^{-8}$ and 0.004, respectively).

The vertigo status was assessed in a cohort of 673 patients (444 unilateral and 229 bilateral). The median duration of recurrent vertigo was 10 years (95% confidence interval, 8.56–11.44) in patients with unilateral MD; however, the median duration of recurrent vertigo in patients with bilateral MD was significantly longer (12 years (10.4–13.6), log-rank test, $p = 0.03$; Fig. 1A). The time-course of hearing stage was also examined in 611 patients (403 unilateral and 208 bilateral). The median of years to reach stage 4 (>75 dB) was 27 and 24 years in patients with unilateral and bilateral SNHL, respectively (log-rank test, $p = 0.36$; Fig. 1B).

Table 2. Clinical phenotype in 466 patients with MD with at least 5 years since the onset of the disease.

VARIABLES	BILATERAL (n = 191)	UNILATERAL (n = 275)	P value
Age of onset (SD)	45 (14)	44 (12)	0.64
Gender (% women)	55.0	57.4	0.60
Affected ear (%)	40.3	Left, 32.0 Right 27.7	
Hearing loss at diagnosis*, mean (SD)	59.3 (15.7)	49.9 (19.3)	2.9×10^{-6}
Headache, n (%)	65 (38)	77(31)	0.17
Migraine, n (%)	20 (10)	30 (11)	0.88
Rheumatoid history, n (%)	28 (15)	35 (13)	0.83
Smoking, n (%)	37 (19)	62 (23)	0.11
Coffee drinking n (%)	39 (20)	54 (20)	0.92
Hearing stage, n (%)	Worst ear	Affected ear	
1	3 (2)	25 (10)	
2	37 (22)	84 (34)	
3	85 (50)	106 (43)	
4	46 (27)	30 (12)	
Time-course (years) mean +/- SD	13±8	11±7	0.002
Hearing stage**, mean (SD)	3.0 (0.7)	2.6 (0.8)	5.2×10^{-8}
Class, n (%)			
A	66 (35)	120 (44)	0.05
B or C	125 (65)	155 (56)	
Tumarkin crisis n (%)	27 (25)	31 (19)	0.23
Functional scale, n (%)			
1	32 (18)	47 (19)	0.004
2	44 (25)	81 (33)	
3	37 (21)	58 (23)	
4	27 (16)	42 (17)	
5	22 (13)	6 (2)	
6	4 (2)	3 (1)	

*Pure tone average (PTA, hearing loss at diagnosis) and time-course were compared by unpaired Student's t test. The rest of qualitative variables were compared by Chi-squared test.

**Hearing stage calculated for the worst ear in bilateral MD.

doi:10.1371/journal.pone.0026759.t002

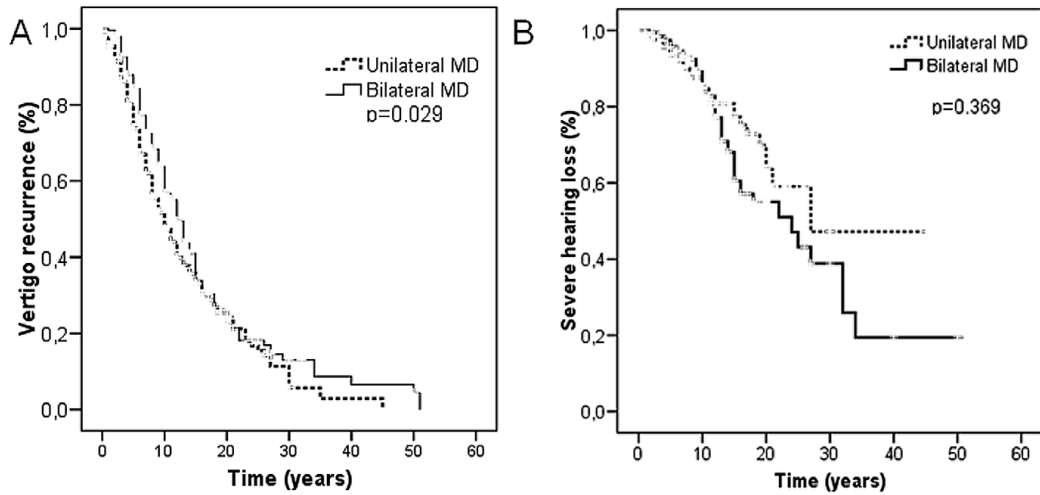


Figure 1. Median duration of recurrent vertigo was longer in patients with bilateral MD (A, log-rank test, $p=0.03$). Time to reach hearing stage 4 was used to compare hearing loss progression among patients with uni or bilateral MD (B, log-rank test, $p=0.36$).
doi:10.1371/journal.pone.0026759.g001

Table 3. Autoimmune diseases diagnosis found among 575 patients with MD[†].

Disease	Unilateral (N = 378)	Bilateral (N = 197)	TOTAL	Prevalence
Rheumatoid arthritis	5	3	8	1,39
Psoriatic arthritis	1	0	1	0,17
Oligoarthritis	1	0	1	0,17
Ankylosing spondylitis	0	4	4	0,70
Paget disease	1	0	1	0,17
Rheumatic polymyalgia	1	1	2	0,35
Systemic lupus erythematosus	4	1	5	0,87
Sjogren Syndrome	2	1	3	0,52
Autoimmune hypothyroidism	7	0	7	1,22
Graves disease	2	2	4	0,70
Autoimmune thyroiditis	2	0	2	0,35
Type I diabetes	1	1	2	0,35
Autoimmune thrombocytopenia	1	0	1	0,17
Primary liver cirrosis	1	0	1	0,17
Autoimmune hepatitis	0	1	1	0,17
Ulcerative colitis	2	1	3	0,52
Rheumatoid fever	2	0	2	0,35
Neumonitis	1	0	1	0,17
Sarcoidosis	0	1	1	0,17
Psoriasis	1	3	4	0,70
Undetermined	4	5	9	1,57
Overall, N	39	24	63	
Prevalence	10,29	12,18	10,95	

[†]Bold values are higher than expected in the general population.
doi:10.1371/journal.pone.0026759.t003

High prevalence of autoimmune diseases

AD was assessed in a subset of 575 patients in our series (Table 3). Eight patients had rheumatoid arthritis (RA), five were diagnosed of systemic lupus erythematosus (SLE) and four subjects had ankylosing spondylitis (AS). The estimated prevalence of these systemic AD in our series of MD was 1.39 for RA, 0.87 for SLE and 0.70 for AS. The rest of immune conditions were observed with the same frequency that expected in the general population in Caucasians. The overall estimated prevalence of ADs did not differ between patients with uni or bilateral SNHL ($p = 0.17$). However, AD were most commonly observed among patients with migraine than subjects with tension-type headache ($p = 0.007$). There were 72 patients with migraine and MD in our cohort, and 19 of them (26%) of had a diagnosis of an AD. However, only 10 of 98 (10%) patients with tension-type headache has AD.

Immunological profile in patients with MD

Immunological testing did not found differences for ANA, C3, C4, CIC, IgG, IgM, IgA or lymphocytes population between patients with MD and uni or bilateral SNHL (Table 4). Serum levels of TNF α and INF γ were not different from controls in either unilateral or bilateral MD (Table 5).

Predictive factors for hearing loss and vertigo

Two multiple linear regression models were designed by using hearing stage and the frequency of vertigo as the dependent variables to determine which factors could explain their variability (Table 6). Hearing stage depended upon bilaterality, hearing loss at diagnosis and lymphocyte T (CD19) cells ($R^2 = 0.52$, $p = 0.01$). In addition, patients who reported vertigo in the last six months showed a significant association with the score in the functional

Table 4. Comparison of standard immunological variables between patients with unilateral and bilateral MD.

	Total	Bilateral	Unilateral	P value
ANA IIF 1/160 (%)	30/400 (7)	12/153 (8)	18/247(7)	0.85
ANA ELISA (%)	7/71 (10)	3/33 (9)	4/38 (10)	1.00
ENA (%)	14/315 (4)	8/135 (6)	6/180 (3)	0.28
Anti dsDNA	4/116 (3)	2/46 (4)	2/70 (3)	0.65
C3 increase (%)	42/437 (10)	20/171 (12)	22/266 (8)	0.49
C4 increase (%)	55/437 (13)	26/170 (15)	29/267 (11)	0.22
CIC increase (%)	36/422 (8)	17/164 (10)	19/258 (7)	0.28
IgM increase (%)	28/333 (8)	8/127 (6)	20/206 (10)	0.32
IgG increase (%)	8/333 (2)	1/128 (1)	7/205 (3)	0.16
IgA increase (%)	21/315 (7)	7/123 (6)	14/192 (7)	0.84
Lymphocyte populations				
CD4 cells				
Low	17/386 (4)	6/158 (4)	11/228 (5)	0.35
Increase	19/386 (5)	5/158 (3)	14/228 (6)	
CD8 cells				
Low	10/391 (3)	7/160 (4)	3/231 (1)	0.15
Increase	25/391 (7)	9/160 (6)	16/231 (7)	
CD16 cells increase	22/192 (11)	9/89 (10)	13/103 (13)	0.35
CD19 cells increase	21/190 (11)	7/86 (8)	14/104 (13)	0.40
CD3 cells increase	27/361 (7)	7/144 (5)	20/217 (9)	0.27

doi:10.1371/journal.pone.0026759.t004

Table 5. Comparison of serum TNF α and INF γ concentrations (mean \pm SD) between patients with MD and controls.

Cytokine	Bilateral (N = 29)	Unilateral (N = 44)	Controls (N = 99)	P value
TNF α	16.6 \pm 21.6	11.7 \pm 19.8	11.1 \pm 15.0	0.32
INF γ	5.0 \pm 6.5	3.7 \pm 3.2	3.5 \pm 3.5	0.25

doi:10.1371/journal.pone.0026759.t005

scale, lymphocyte B (CD8) cells and complement factor C4 ($R^2 = 0.12$, $p = 0.05$).

Discussion

The frequency of vertigo attacks and the SNHL are the most remarkable features of MD and they show a significant variability among patients. We have found an increased prevalence of systemic AD such as RA, SLE and AS in our series, and an association between migraine and AD not previously reported in patients with MD.

We have preferred to use the term bilateral SNHL instead of bilateral MD, since it is difficult to know which ear is causing an episode of vertigo in cases with synchronic SNHL.

Hearing loss at diagnosis is worse in patients with bilateral SNHL and this could be explain either by a diagnostic delay of these cases or by a more severe onset with hearing loss in these patients. The profile of SNHL was different in patients with unilateral or bilateral hearing loss, and when hearing levels were corrected by age, low-tone hearing loss was found in unilateral MD, but a pantonal hearing loss was observed in bilateral cases [21]. This is a relevant finding, since a pantonal SNHL may be a predictor of bilateral affection [21]. Hearing stage was worse for patients with bilateral SNHL when the worst ear was compared with the affected ear in individuals with unilateral MD. Since hearing loss fluctuates in the first years [2,3,22], and some patients can develop the disease in the second ear, we also compared clinical and immunological variables in patients with unilateral and bilateral SNHL with at least 15 years since the onset of the disease, to avoid the inclusion of bilateral cases as unilateral MD (cases which potentially can develop the disease in the second ear). The mean time course in these subsets

Table 6. Multiple linear regression analysis for clinical and immunological variables associated with hearing loss and frequency of vertigo in MD.

Symptom	Factor	R ²	R ² corrected	B	p value
Hearing loss N = 186	(Constant)	0.52	0.51	0.41	0.021
	1 Bilateral hearing loss			0.47	8.6 \times 10 ⁻⁶
	2 Hearing loss at diagnosis			0.03	1.5 \times 10 ⁻¹⁸
	3 CD19 cells increase			-0.36	0.010
Vertigo N = 365	(Constant)	0.12	0.11	0.30	2.9 \times 10 ⁻⁸
	1 Functional level			0.11	5.1 \times 10 ⁻¹⁰
	2 CD8 cells increase			-0.20	0.015
	3 C4 increase			0.30	0.054

B is the coefficient of regression.

doi:10.1371/journal.pone.0026759.t006

was 21 and 22 years, but no difference were found at hearing levels, suggesting that after 20 years of the disease the mean SNHL seems to be the same in all patients.

Headache is a common complaint in these patients either with uni or bilateral hearing loss, but patients with a clinical diagnosis of migraine according to the IHS criteria was observed with the same frequency as described in the general population, confirming the findings in a recent wide epidemiologic study [23]. Our current data do not support the hypothesis that migraine is more frequent in patients with bilateral SNHL.

Previous studies have shown that the number of episodes of vertigo is greater in the first few years of the disease [2,3,19], and the number of patients without episodes of vertigo increases with time [19]. However, these studies did not include enough number of patients with bilateral SNHL to investigate clinical differences between uni and bilateral MD.

Our study shows differences in the number of years with episodes of vertigo between patients with unilateral and bilateral SNHL. Vertigo attacks last two more years in patients with bilateral hearing loss, suggesting that both ears could be involved in the occurrence of the spells. Previous studies defined two phases in the natural evolution of episodes of vertigo in MD: the first eight years with more crises in the initial four years, and a second phase which extend from 9 to 20 years with a stable frequency of episodes [19]. Our Kaplan-Meier analyses demonstrate that the time-course of episodes of vertigo is different in patients with unilateral and bilateral SNHL, suggesting that the condition causing the episodes may persist for a longer period of time in cases with bilateral SNHL.

Autoimmune inner ear disease (AIED) is a syndrome of rapidly progressive, often fluctuating, bilateral SNHL over a period of weeks to months. Vestibular symptoms may be present in almost 50% of patients and systemic AD coexists in 15–30% of patients [24]. In some cases, AIED begins as sudden SNHL in one ear progressing rapidly to the second ear with tinnitus and balance symptoms which may resemble MD [25]. Currently, there is not biological marker for diagnosis of AIED or MD, but immune dysfunction is increasingly being recognized in MD. Patients with AIED treated with corticosteroids may improve SNHL in 50% cases at short term and in 14% after 34 months [26], so the response to steroids is not a reliable criteria to exclude MD, according to the AAO-HNS guidelines [18]. We have found an increase of systemic AD in patients with MD in our series (RA, SLE and AS). For RA and AS, the estimated prevalence in patients with MD was 2–3 times more common [27], but for SLE the prevalence was 8 times more frequent [28]. Although small series of patients with SLE has described cases with SNHL, vertigo is not a usual symptom in these patients. A recent study described a high-frequency SNHL and abnormal findings in vestibular testing in a series of patients with AS, but this findings do not fulfill the criteria for diagnosis of MD [29].

We propose that AIED would be a continuum that would include sudden SNHL, rapidly progressive SNHL or MD that could be associated with other autoimmune conditions such as systemic AD.

Moreover, systemic ADs were most commonly observed in patients with MD and migraine than in cases with MD and tension-type

headache. This finding suggests that AD should be considered in all cases, but especially in patients with MD and migraine. Further studies are needed to confirm the spectrum of MD-AD-migraine.

Our data show that an immunological panel including ANA, Igs, C3, C4, CIC, TNF and INF can not be used as biological marker for diagnosis of patients with AIED or predictor for uni or bilateral SNHL. Although several reports found elevated CIC in 54–96% of patients with MD using a polyethylene glycol precipitation assay [10,30], another study using our method, a solid phase immunosorbent assay (ELISA) for C1q and IgG also found an elevation of CICs in 4% of 49 patients with MD [31]. Our data confirm this study and found elevated CIC in 8% of 422 patients. Moreover, subanalysis of patients with uni or bilateral MD did not show a higher frequency of elevated CIC. Our data cannot support that pathophysiology of MD is different in patients with uni or bilateral involvement, although patients with bilateral SNHL display a more severe disease.

Finally, we had shown that bilaterality and SNHL at diagnosis are stronger predictors of hearing levels during follow-up. Moreover, lymphocytes B are associated with the hearing level and CD8+ T lymphocytes are associated with the recurrence of vertigo, suggesting that the immune response may determine the outcome of MD. CD4+ T lymphocytes predominate in the endolymphatic sac, while CD8+ T lymphocytes are normally scanty, but the relationship between CD4+ and CD8+ T cells may be inverted in case of chronic antigen stimulation, as in the presence of acoustic neuroma [32]. Monitoring the CD4+ and CD8+ T lymphocytes during the spells of vertigo could help to define AIED and MD.

Despite some limitations of a case series of MD, our study has found a higher prevalence of systemic AD within patients with MD. Moreover, these patients are more likely to have migraine and they may represent an endophenotype within MD. Additional multicenter studies should confirm the high prevalence of SLE, RA and AS and the relationship with migraine.

Conclusions

- Patients with MD display an elevated prevalence of systemic ADs such as RA, SLE and AS.
- AD was more frequent in patients with MD and migraine, despite the prevalence of migraine in MD in our series does not differ from the observed prevalence in the general population.
- B lymphocytes are related with hearing loss and and CD8+ T lymphocytes with persistence of vertigo, suggesting a role for the immune response in the activity and progression of MD.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ASV IA SS AB GT HPG JALE. Performed the experiments: IG CGO LA. Analyzed the data: IG ASV IA SS AB GT HPG JALE. Contributed reagents/materials/analysis tools: IG CGO LA JALE. Wrote the paper: JALE ASV IA SS AB GT HPG.

References

1. Sajjadi H, Paparella M (2008) Meniere's disease. *Lancet* 372: 406–14.
2. Stahle J, Friberg U, Svedberg A (1989) Long-Term progression of Meniere's disease. *Am J Otol* 10: 170–3.
3. Green JD, Jr., Blum DJ, Harner SG (1991) Longitudinal follow-up of patients with Meniere's Disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 104: 783–8.
4. House JW, Doherty JK, Fisher LM, Derebery MJ, Berliner KI (2006) Meniere's disease: prevalence of contralateral ear involvement. *Otol Neurotol* 27: 355–61.
5. Lopez-Escamez JA, Viciana D, Garrido-Fernandez P (2009) Impact of bilaterality and headache in health-related quality of life in Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 118: 409–16.
6. Riente L, Bongiorno F, Nacci A, Migliorini P, Segnini G (2004) Antibodies to inner ear antigens in Meniere's disease. *Clin Exp Immunol* 135: 159–63.
7. Nacci A, Dallan I, Monzani F, Dardano A, Migliorini P (2010) Elevated antithyroid peroxidase and antinuclear autoantibody titers in Meniere's disease patients: more than a chance association? *Audiol Neurotol* 15: 1–6.
8. Yeo SW, Park S, Jeon E, Lee HY, Pyo CW, et al. (2002) Influence of human leucocyte antigen in the pathogenesis of Meniere's disease in the south Korean population. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 851–56.
9. Lopez-Escamez JA, Vilchez JR, Soto-Varela A, Santos-Perez S, Perez-Garrigues H, et al. (2007) HLA-DRB1*1101 allele may be associated with

Autoimmune Disease in Menière's Disease

- bilateral Meniere's disease in southern European population. *Otol Neurotol* 2007; 28: 891–5.
10. Derebery MJ, Rao VS, Siglock TJ, Linthicum FH, Nelson RA (1995) Meniere's disease: an immune complex-mediated illness? *Laryngoscope* 101: 225–229.
 11. Yoo TJ, Shea J, Jr., Ge X, Kwon SS, Yazawa Y, et al. (2001) Presence of autoantibodies in the sera of Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110: 425–9.
 12. Yoo T, Yazawa Y, Tomoda K, Floyd R (1983) Type II collagen induced autoimmune endolymphatic hydrops in guinea pig. *Science* 222: 65–7.
 13. Lopez-Escamez JA, Saenz-Lopez P, Acosta L, Moreno A, Gazquez I, et al. (2010) Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease. *Laryngoscope* 120: 103–7.
 14. Rauch SD, San Martín JE, Moscicki RA, Bloch KJ (1995) Serum antibodies against heat shock protein in Meniere's disease. *Ann J Otol* 16: 648–52.
 15. Shin SO, Billings PB, Keithley EM, Harris JP (1997) Comparison of anti heat shock protein 70 and anti 68-kD inner ear protein in the sera of patients with Meniere's disease. *Laryngoscope* 107: 222–7.
 16. Ruckenstein MJ, Prasthoffer A, Bigelow DC, Von Feldt JM, Kolasinski SL (2002) Immunologic and serologic testing in patients with Meniere's disease. *Otol Neurotol* 23: 517–21.
 17. Sushu N, Yilmaz T, Gursel B (2009) Utility of immunologic parameters in the evaluation of Ménière's disease. *Acta Otolaryngol* 129: 1160–5.
 18. Committee on Hearing and Equilibrium (1995) Guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 181–185.
 19. Perez-Garrigues H, Lopez-Escamez JA, Perez P, Sanz R, Orts M, et al. (2008) Time course of episodes of definitive vertigo in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134: 1149–1154.
 20. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society (2004) The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1: 9–160.
 21. Belinchon A, Perez-Garrigues H, Tenias JM, Lopez A (2011) Hearing assessment in Meniere's disease. *Laryngoscope* 121: 622–6.
 22. Wladislavsky-Waserman P, Facer GW, Mokri B, Kurland LT (1984) Meniere's disease: a 30-year epidemiologic and clinical study in Rochester, Mn, 1951–1980. *Laryngoscope* 94: 1098–1102.
 23. Gopen Q, Virre E, Anderson J (2009) Epidemiologic study to explore links between Ménière syndrome and migraine headache. *Ear Nose Throat J* 88: 1200–4.
 24. Bovo R, Aimoni C, Martini A (2006) Immune-mediated inner ear disease. *Acta Otolaryngol* 126(10): 1012–21.
 25. McCabe BF (1979) Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88: 583–9.
 26. Brogton SS, Meyerhoff WE, Cohen SB (2004) Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience. *Semin Arthritis Rheum* 34: 544–8.
 27. Gabriel SE, Michaud K (2009) Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality and comorbidity of the rheumatic diseases. Arthritis Res Ther* 11: 229.
 28. Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, et al. (2005) Familial aggregation of Systemic lupus Erythematosus, rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases in 1177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum* 52: 1138–1147.
 29. Amor-Dorado JC, Barreira-Fernandez MP, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, Miranda-Filloo JA, et al. (2011) Audiovestibular manifestations in patients with ankylosing spondylitis. *Medicine* 2011, 90: 99–109.
 30. Savastano M, Giacomelli L, Marioni G (2007) Non-specific immunological determinations in Meniere's disease: any role in clinical practice? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264: 15–19.
 31. Perez Garrigues H, Carmona E, Morera C, Sanchez-Cuenca JM (1995) Circulating auto-antibodies in Meniere's disease. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 112: 225–228.
 32. Alternatt H, Gebbers J, Muller C, Arnold W, Laissue J (1990) Human endolymphatic sac: evidence for a role in inner ear defense. *ORL J Otolaryngol Relat Spec* 52: 143–8.

Genetics of Recurrent Vertigo and Vestibular Disorders

Irene Gazquez¹ and Jose A. Lopez-Escamez^{*,1,2}

¹Otology & Neurotology Group, CTS495, Centro de Genómica e Investigación Oncológica –GENyO Pfizer-Universidad de Granada- Junta de Andalucía, Granada ²Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain

Abstract: We present recent advances in the genetics of recurrent vertigo, including familial episodic ataxias, migrainous vertigo, bilateral vestibular hypofunction and Meniere's disease.

Although several vestibular disorders are more common within families, the genetics of vestibulopathies is largely not known. Genetic loci and clinical features of familial episodic ataxias have been defined in linkage disequilibrium studies with mutations in neuronal genes KCNA1 and CACNA1A. Migrainous vertigo is a clinical disorder with a high comorbidity within families much more common in females with overlapping features with episodic ataxia and migraine. Bilateral vestibular hypofunction is a heterogeneous clinical group defined by episodes of vertigo leading to progressive loss of vestibular function which also can include migraine. Meniere's disease is a clinical syndrome characterized by spontaneous episodes of recurrent vertigo, sensorineural hearing loss, tinnitus and aural fullness and familial Meniere's disease in around 10-20% of cases. An international collaborative effort to define the clinical phenotype and recruiting patients with migrainous vertigo and Meniere's disease is ongoing for genome-wide association studies.

Received on: May 25, 2011 - Revised on: July 07, 2011 - Accepted on: July 08, 2011

Keywords: Vestibulopathies, recurrent vertigo, Meniere's disease, genome-association studies.

INTRODUCTION

Genomic medicine in complex middle or inner ear diseases such as chronic otitis media, otosclerosis or age-related hearing loss is an emerging topic [1]. Patients with imbalance or recurrent vertigo are a heterogeneous group of complex disorders affecting the peripheral and central vestibular system and they represent a diagnostic challenge for the clinicians since their genetic basis is largely not known. Familial episodic ataxias are rare cause of recurrent vertigo, but molecular genetics has identified several mutations on KCNA1 and CACNA1A genes that suggest a key role for voltage-gated channels and solute carriers in the plasma membrane of neurons in recurrent vertigo. Moreover, recent advances in familial vestibular disorders and particularly in familial Meniere's disease have facilitated the pathways for clinical characterization and recruitment of patients for large collaborative studies.

Recurrent vertigo with vestibular hypofunction is a common symptom in clinical practice and there is a hereditary component in neurotologic disorders that is not well defined. Migraine has a strong genetic background and it is frequently observed in these patients and although the genetics for migraine has started to become known [2, 3], the shared allelic variants between vertigo and migraine remain to be discovered. This review will include syndromes with recurrent or episodic vertigo: familial episodic ataxia,

migrainous vertigo, bilateral vestibular hypofunction and Ménière's disease.

FAMILIAL EPISODIC ATAXIAS

Familial episodic ataxias are monogenic recurrent vertigo syndromes. Most of them are autosomal dominant disorders of early onset characterized by recurrent attacks of incoordination, dysarthria and truncal ataxia. There are several subtypes defined by associated interictal findings and genetic characterizations (Table 1). The key clinical feature that raises the diagnosis of episodic ataxia is discrete attacks of incoordination with a clear onset and resolution of symptoms, which also distinguishes episodic ataxia with progressive features from progressive ataxia with intermittent exacerbation. The presence of interictal findings in most patients provides a helpful distinction with vestibular migraine.

Episodic Ataxia Type 1 (EA1)

EA1 is a potassium channelopathy characterized by constant myokymia and episodes of spastic contractions of muscles of the head, arms and legs. The attacks consist of episodes of vertigo lasting minutes associated with diplopia, headache, stiffness of the body and dysarthric speech.

EA1 is caused by mutations in KCNA1 gene located on chromosome 12p13 (MIM 160120), which encodes Kv1.1, a voltage-gated potassium channel [4]. Functional Kv1.1 channels are tetrameric structures composed of four identical monomers, but K⁺ channel diversity is greatly enhanced by the ability to form heteromeric channels composed of Kv1.1 and Kv1.2/Kv1.4/KvB1.1. In several brain areas, Kv1.1 co-assembles with Kv1.4 which confers N-type inactivating

*Address correspondence to this author at the Otology and Neurotology Group CTS495, Centro de Genómica e Investigación Oncológica –GENyO, Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía, Avda de la Ilustración, 114, 18007 Granada, Spain; Tel: 34 958 715500 Ext.128; Fax: 34 958 637071; E-mail: antonio.lopezescamez@genyo.es

Table 1. Genetic and Clinical Summary of Episodic Ataxia Syndromes

EA Type	Age at onset, y	Duration of episodes	Associated symptoms	Interictal findings	Gene locus	Gene
EA1	<20	Minutes	Muscle spasms	Myokimia, seizures	12p13	KCNA1
EA2	<20	Hours	Vertigo, weakness	Ataxia, nystagmus	19p13	CACNA1A
EA3	<20	Minutes	Vertigo, tinnitus, headache	No	1q42	Unknown
EA4	20-50	Hours	Vertigo, diplopia	Nystagmus, abnormal smooth pursuit	Unknown	Unknown
EA5	20-60	Hours	Vertigo	Nystagmus, ataxia	2q22-23	CACNB4
EA6	<10	Hours	Cognitive impairment	Seizures, ataxia	5p13	SLC1A3
EA7	<20	Hours	Vertigo	No	19q13	Unknown

properties to heteromeric channels. It is likely that the rate of inactivation will be determined by the number of Kv1.4 subunits which is increased in EA1 [4], resulting in an increase in neuronal excitability [5, 6]. Individuals with EA1 are heterozygous for a KCNA1 disease-causing mutation, and they have a wild-type and a mutated allele, which may be equally expressed; so, channels composed of wild-type and mutated subunits may be formed, but this heterozygous allele is enough to alter the function of heteromeric channels containing Kv1.1 subunits [7, 8].

The KCNA1 gene has a transcript of 7983 nucleotides with a coding region of 1488 [7]. To date, more than 20 KCNA1 mutations have been described and most are missense mutations distributed throughout the gene [9]. Interestingly, four different mutations of the highly conserved threonine 226 in the second transmembrane segment (T226M/A/R/K) that lead to diverse phenotype have been identified [10].

Episodic Ataxia Type 2 (EA2)

EA2 is a Ca²⁺ channelopathy characterized by recurrent vertigo lasting from hours to days, with imbalance, vomiting, ataxia with interictal nystagmus (MIM 108500). It is distinguished from EA1 by the absence of myokymia (fine rippling of muscles). Episodes are triggered by exercise, an intercurrent infection, stress, alcohol and caffeine and they are often relieved by treatment with the carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide [11]. Migraine occurs in about 50% of patients with EA2.

EA2 is caused by mutations in the CACNA1A gene, mapped to chromosome 19p13 [12], which encodes the α -subunit of the P/Q-type voltage-gated calcium channel, Ca_v2.1 [13, 14]. This gene is widely expressed throughout the CNS, showing highest levels at Purkinje and granule cells of the cerebellum.

Dominant mutations in CACNA1A underlie at least three allelic diseases: EA2, familial hemiplegic migraine type 1 and spinocerebellar ataxia type 6. A large number of different single nucleotide mutations have been shown to cause EA2 which results in premature stop codons and a non functional protein with loss of Ca_v2.1 channel function [15, 16], including recent mutations in the promoter and a new final exon 48 [16]. Moreover, these mutant subunits may disrupt

the membrane trafficking of wild-type subunits [17]. CACNA1A alternative splicing in the cerebellum of selected exons harboring nonsense mutations (such as exon 37A) can also cause EA2 [18]. Direct sequencing of CACNA1A in some patients with EA2 does not identify any point mutation, but the use of methods such as MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) and QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments) has demonstrated large-scale CACNA1A gene rearrangements (deletions and duplications) in patients with EA2 [19,20].

Familial hemiplegic migraine type 1 is a form of migraine with aura and reversible hemiparesis also caused by missense nucleotide mutations in the CACNA1A gene that alter channel gating and enhance the channel activity at negative potentials [21].

Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is an autosomal dominant disorder characterized by a late onset slowly progressive ataxia, dysarthria and nystagmus associated with an abnormal CAG expansion in exon 47 of CACNA1A gene [22]. The normal number of CAG repeats ranges up to 18 and individuals with SCA6 have 20 to 33 repeats in the carboxy-terminal domain, resulting in a polyglutamine expansion of the carboxyl-terminal domain [22].

Episodic Ataxia Type 3 (EA3)

EA3 (MIM 606554) was described in 26 members of a single large Canadian family with episodic vertigo, tinnitus, ataxia, migraine and interictal myokymia [23]. Patients respond to acetazolamide and no residual ataxia was observed after the episodes. The disease locus for EA3 has been mapped to chromosome 1q42 [24].

Episodic Ataxia Type 4 (EA4)

EA4, also called familial periodic vestibulocerebellar ataxia (MIM 606552), is an autosomal dominant disorder characterized by episodes of vertigo and ataxia beginning in the third to sixth decade of life described in two families of North Carolina, USA [25, 26]. Patients may have interictal nystagmus and mild ataxia similar to EA2 or they may be completely normal in between attacks. The episodes usually last for hours and are not relieved by acetazolamide. The most consistent symptom is the inability to suppress the vestibulo-ocular reflex. Linkage analysis ruled out the EA1 and

EA2 loci as well as loci for SCA1–5 [27], but the locus has not been identified.

Episodic Ataxia Type 5 (EA5)

EA5 (MIM601949) was identified when a series of families with episodic ataxia and epilepsy harboured mutations in the calcium channel β_4 subunit CACNB4, on chromosome 2q22–23 [28]. The premature-termination mutation R482X was identified in a patient with juvenile myoclonic epilepsy. The R482X protein lacks the 38 C-terminal amino acids containing part of an interaction domain for the subunit. The missense mutation C104F was discovered both in a German family with generalized epilepsy and praxis-induced seizures and in a Canadian family with episodic ataxia. These coding mutations were not detected in unaffected controls [29].

Episodic Ataxia Type 6 (EA6)

EA6 (MIM612656) was first identified in a 10-year-old child with an episodic and progressive ataxia, seizures, alternating hemiparesis and episodes of migraine [30]. A de-novo P290R heterozygous mutation was identified by candidate gene approach in SLC1A3 (MIM 600111). This is a solute carrier gene which encodes the glial excitatory amino acid transporter type 1 (EAAT1), which is involved in glutamate removal from the synapses [30]. A second mutation C186S was identified in 3 symptomatic members of a family with EA, without motor symptoms or seizures, suggesting a relationship between the phenotype and the extent of glutamate transporter dysfunction [31].

Episodic Ataxia Type 7 (EA7)

EA7 (MIM611907) was described in a family of 7 members with vertigo, weakness, dysarthria and ataxia lasting from hours to days typically triggered by exercise or excitement, with onset before age 20 [32]. There is no interictal finding (which distinguishes it from EA3). Genome scan mapped the locus of EA7 between rs1366444 and rs952108 on chromosome 19q13.

VESTIBULAR MIGRAINE (VM)

Migraine is an episodic headache disorder affecting 8% of males and 17% of females [33]. Clinically, the International Classification of Headache Disorders (ICHD-II) [34] recognizes two main common forms of migraine: migraine with aura and migraine without aura. The two forms are distinguished from each other based on the presence of aura, a period of variable and diverse neurological symptoms that precedes the headache phase. There is a dilemma among the scientific community whether migraine with aura and migraine without aura attacks represent two different disorders or if they are variations of a single disease having a common complex genetic background.

The clinical criteria required for diagnosing VM are current or previous history of migraine according to ICHD-II criteria [34] and at least 2 attacks of vertigo presenting with 1 of the following symptoms: migrainous headache, photophobia, phonophobia, or visual or other auras. Vertigo is not considered to be an aura of migraine [35]. VM is found in 1–3% of the population, being the most common cause of re-

current vertigo. Migraine is a complex polygenic disease and this may explain clinical heterogeneity (migraine, aura or vertigo).

A recent genome-wide association study of 2731 European migraine patients has identified rs1835740 on chromosome 8q22.1 ($P = 5.38 \times 10^{-9}$, odds ratio = 1.23, 95% CI 1.150–1.324). The association was replicated in 3,202 cases and 40,062 controls [2]. The rs1835740 is located between MTDH (astrocyte elevated gene 1, also known as AEG-1) and PGCP (encoding plasma glutamate carboxypeptidase). In an expression study in lymphoblastoid cell lines, transcript levels of the MTDH were found to have a significant correlation with rs1835740 minor allele. MTDH down-regulates SLC1A2, the gene encoding the major glutamate transporter (EAAT2) in the brain [36, 37], suggesting that the identified variant regulates glutamate in the synapsis. In another population-based genome-wide analysis including 5122 migraineurs and 18108 non-migraineurs individuals, rs2651899 (1p36.32, PRDM16) rs10166942 (2q37.1, TRPM8) and rs11172113 (12q13.3, LRP1) were among the top markers associated with migraine. The meta-analysis of three replication cohorts including 774 from Netherlands, 306 from Germany and 2748 from the International Headache Genetics Consortium confirmed the association when discovery and replication cohorts were pooled [3]. TRPM8 encodes a sensor for cold and cold-induced pain and is a target for neuropathic pain [38]. The potential role of PRDM16 in migraine is unclear. LRP1 is a member of the lipoprotein family which modulates synaptic transmission and co-localizes with NMDA receptor in neurons [39], supporting that glutamate homeostasis is relevant in the pathophysiology of migraine. Future challenges should be a GWAS in VM patients, since this is a subtype of migraine patients to define endophenotypes and a fine mapping analysis of MTDH, TRPM8 and LRP1 genes in VM.

Familial Migrainous Vertigo/Familial VM

In 1994, a set of three families with multiple members who experienced migraine and episodes of vertigo lasting minutes followed years later by progressive loss of peripheral vestibular function was reported [40]. A 4-generation family with 23 members with vestibular migraine inherited as a dominant trait has been described [41]. Members of this family have episodic vertigo and migraine with aura. A genome-wide screen for loci linked to MV segregating in this large family and subsequent fine structure mapping demonstrated that the disease gene is located between loci rs244895 and D5S2073 in chromosome 5q35. Candidate genes in this region, including KCNMB1 (Kv channel interacting protein 1 isoform 1), KCNIP1 (potassium large conductance calcium activated), ATP6V0E (ATPase, H⁺ transporting, lysosomal, V0 subunit E), SLC34A1 (solute carrier family 34 sodium phosphate), GABRP (gamma-amino butyric acid-GABA A receptor); DRD1 (dopamine receptor D1); and HRH2 (histamine receptor H2) were sequenced, but no mutation was identified [41].

BILATERAL VESTIBULAR HYPOFUNCTION (BVH)

A small family with recurrent vertigo without migraine neither hearing loss was described in 2003 [42]. The epi-

sodes of vertigo were triggered by exercise and stress, and patients showed improvement with acetazolamide. In the later stages, when the frequency of vertigo attacks diminished, the patients developed imbalance and oscillopsia. In contrast to the large number of deafness genes, no mutations have been identified in BVH with normal hearing. Improving of phenotyping of patients with recurrent vertigo and BVH, excluding ototoxicity is essential to investigate their genome. BVH is usually progressive and it is observed after longer periods of follow up, usually in subjects over 60 years-old, making difficult the recruitment of patients within a family from more than two generations. Moreover, selection of sporadic cases with BVH also requires long follow-up periods to confirm BVH.

There has been a single report of linkage analysis in families with a dominantly inherited bilateral vestibulopathy syndrome associated with migraine and normal hearing [43]. The preliminary analysis showed genetic heterogeneity. Since the human inner ear transcriptome has been obtained, collaborative efforts in identifying and recruiting patients with familial vestibulopathy will help identify genes by high throughput sequencing methods.

MENIERE DISEASE

Meniere's disease (MD [MIM 156000]) is defined as an inner ear disorder characterized initially by fluctuating low-frequency sensorineural hearing loss, recurrent vertigo attacks, aural fullness, and tinnitus. Patients experience a high frequency of vertigo attacks during the first years which decrease over time and develop progressive imbalance and severe profound hearing loss [44]. The second ear could be affected in around 15-40% of cases. A disturbance of the cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential has been involved in the development of MD [45], and endolymphatic hydrops has been consistently identified as a histological feature in temporal bone specimens from patients with MD.

MD is a complex genetic disorder and several features of MD suggest a genetic or epigenetic component. The prevalence of the disease is more common in European Caucasians than in Asian or African populations. Familial cases

represent 4-20% of all patients and several MD pedigrees have been reported, mostly in Caucasians [46, 47].

Familial Meniere's Disease (FMD)

A familial history of MD has been described in 10-19% of cases (Table 2). The inheritance of MD has been reported to be autosomal dominant with incomplete penetrance estimated around 60% [48-50]. Anticipation for FMD, dependent upon the number of MD patients per generation has been described in several families, including both earlier onset and tendency to more severe symptoms in successive generations [51-54]. In addition, several Brazilian families with concurrent MD and migraine have also been described [55].

A candidate region for FMD was identified on chromosome 12p12.3 from linkage analysis in three large Swedish families [56]. This region was analyzed in 15 families with several cases segregating FMD in at least two patients. The confirmed allelic association defines an haplotype in 12p12.3 between the markers D12S373 and GT27 [57]. Two genes are located in the region: RERG/RAS-like gene (RERGL) and PIK3C2G gene; however, none of these genes show any alterations in the coding sequences in patients with FMD. In contrast, two non-coding SNPs close to exon 29 of PIK3C2G, rs12827507 and rs11044211 were strongly associated with FMD in Swedish families [57].

Another study in 19 German families with 52 members affected by FMD (27% bilateral FMD) found linkage with a region on chromosome 5 (LOD score =1.9) and 13/19 families showed consistent linkage to the region identified by D5S644, which contains 105 known genes [47]. The association observed in these families replicates an earlier linkage analysis using data from different families. Moreover, these families had a prevalence of migraine around 39% and presented an earlier onset in the third and fourth generation.

FMD has also been investigated in Finland in 8 families with 17 individuals with definite FMD [58]. The inheritance was autosomal dominant and the majority of patients were women, a finding also observed in British and German patients with FMD [47, 49]. A recent study in 16 Finnish families did not confirm anticipation, co segregation with mi-

Table 2. Linkage Association Studies in Familial Ménière's Disease

Gene locus	Ethnic	Candidate gene	Anticipation	Replication	Phenotype
12p12.3	Swedish	PIK3C2G	Y	No	MD, migraine
14q11-11	UK	None	Y	No	MD, migraine
DFNA9 - 14p11.2	Belgium, Netherland	COCH	Y	Y	Sensorineural hearing loss and vestibular dysfunction
5	German	None	?	No	MD, migraine. Bilateral 27%
Unknown	Brazilian	None	?	No	MD and migraine
Unknown	Finnish	None	No	No	MD
1q32.1-32.3	Chilean- North Spain	SCLA45A3	?	No	MD

Table 3. History of Candidate Gene Association Studies in Ménière's disease. None of them were Replicated in an Independent Population

Gene	Paper	Phenotype	Cases	Controls	Odds ratio	P value
HLA-DRB1*1201	Koyama S <i>et al.</i> 1993	Sporadic MD	20	0,04
COCH	Fransen E <i>et al.</i> 1999	Familial MD	23	119
HLA-DRB1*09	Meng X <i>et al.</i> 2001	Sporadic MD	60	85	0,2	0,01
Antiquitin	Lynch M <i>et al.</i> 2002	Familial MD	9
HLA-Cw*07	Melchiorri L <i>et al.</i> 2002	Sporadic MD	41	101	3,6	6,9.E ⁻³
HLA-DRB1*0405	Koo JW <i>et al.</i> 2003	Sporadic MD	41	226	8,51	0,006
KCNE1	Doi K <i>et al.</i> 2005	Sporadic MD	63	205	NC	NC
KCNE3	Doi K <i>et al.</i> 2005	Sporadic MD	63	237	NC	NC
HLA-DRB1*1101	Lopez-Escamez JA <i>et al.</i> 2007	Sporadic MD	80	250	3,65	0,029
Alpha-adducin	Teggi R <i>et al.</i> 2008	Sporadic MD	28	48	...	0,0034
HSP 70	Kawaguchi S <i>et al.</i> 2008	Sporadic MD	49	100	...	<0,001
PARP-1	Lopez-Escamez JA <i>et al.</i> 2009	Bilateral MD	80	371	7,33	0,012
PTPN22	Lopez-Escamez JA <i>et al.</i> 2010	Bilateral MD	52	348	2,25	0,04
FcγRIIIa	Lopez-Escamez JA <i>et al.</i> 2011	Sporadic MD	156	626	1,49	0,054
NOS1/NOS2A*	Gazquez I <i>et al.</i> , 2011	Sporadic MD	381	667	0,89	0,56

*A CCTTT microsatellite was initially associated in Galicia population, OR=0.37, corrected p=0.04.

graine or linkage to the 12p12.3 region found in Swedish FMD, suggesting genetic heterogeneity within FMD [58].

Massive parallel sequencing of the whole exoma in selected cases of FMD is an emerging high-throughput method that will facilitate the discovery of new genes by eliminating the need for linkage analysis and candidate gene screening [59].

Sporadic Meniere's Disease

A candidate gene approach, either by case-control studies or by the sequencing of selected genes, has been used to search genetic markers associated with MD (Table 3). These genes include antiquitin [60], aquaporin 2 [61], COCH (*coagulation factor C homology*) [62], potassium channels genes (KCNE1 and KCNE3) [63], MHC class II genes [64, 65], alpha-adducin [66], heat-shock protein 70 [67], PARP-1 [68], PTPN22 [69], Fc gamma receptors CD32 and CD16a [70] and nitric oxide synthases type 1 and 2 [71]. However, none of these genes could be replicated in an independent set of MD patients [72-74].

The HapMap3 Project has defined 10 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) throughout the human genome providing markers for a detailed analysis in any chromosomal region, predicting that an SNP will be in linkage disequilibrium to the gene or mutation of interest. The combination of efficient techniques for high throughput genotyping with dense SNP maps offers a high level of definition for genome-wide association studies.

SNP-based scans using biallelic polymorphisms are most likely to detect common sequence variants associated with

disease development than candidate gene or familial linkage approaches. The effect size of these common variants has been small (odds ratio, <2), and a common genetic variant will not account for the entire heritability of MD. This observation leads to investigations of rare variants, copy number variation, and epigenetic modifications to explain the entire heritability of a given disease [75, 76]. Rare structural variants are suspected to account for the molecular differences underlying varied clinical phenotypes and they will be associated with FMD.

Ultimately, definition of allelic variants for MD will need confirmation through experimental modeling demonstrating physiologic dysfunction. Discovery of a mechanism of disease development will advance accuracy of the diagnosis and refinement of clinical phenotypes, and provide new targets for pharmacologic intervention. Currently, an international consortium, named GENOMEN, has been organized to define the clinical phenotype and to investigate common and rare variants in 2000 European Caucasian adults with MD, to identify genetic markers for the disease and define its biochemical pathways.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Research Grant AES PI10/00920 from Instituto de Salud Carlos III and EU Regional Development Funds (FEDER).

REFERENCES

- [1] Lopez-Escamez, J.A. Role of genomic medicine in middle and inner ear diseases. *Acta Otorrinolaringol. Esp.* 2011, PMID: 21700264.

- [2] Anttila, V.; Stefansson, H.; Kallela M.; Todt, U.; Terwindt, G.M.; Calafato, M.S.; Nyholt, D.R.; Dimas, A.S.; Freilinger, T.; Müller-Myhsok, B.; Arto, V.; Inouye, M.; Alakurtti, K.; Kaunisto, M.A.; Hämäläinen, E.; de Vries, B.; Stam, A.H.; Weller, C.M.; Heinze, A.; Heinze-Kuhn, K.; Goebel, I.; Borck, G.; Göbel, H.; Steinberg, S.; Wolf, C.; Björnsson, A.; Gudmundsson, G.; Kirchmann, M.; Hauge, A.; Werge, T.; Schoenen, J.; Eriksson, J.G.; Hagen, K.; Stovner, L.; Wichmann, H.-E.; Meitinger, T.; Alexander, M.; Moebus, S.; Schreiber, S.; Aulchenko, Y. S.; Breteler, M.M.B.; Uitterlinden, A. G.; Hofman, A.; van Duijn, C.M.; Tikka-Kleemola, P.; Vepsäläinen, S.; Lucae, S.; Tozzi, F.; Muglia, P.; Barrett, J.; Kaprio, J.; Färkkilä, M.; Peltonen, L.; Stefansson, K.; Zwart, J.A.; Ferrari, M.D.; Olesen, J.; Daly, M.; Wessman, M.; van den Maagdenberg, A.M.J.M.; Dichgans, M.; Kubisch, C.; Dermatzakis, E.T.; Frants, R.R.; Palotie, A. for the International Headache Genetics Consortium. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat. Genet.*, **2010**, *42*(10), 869-873.
- [3] Chasman, D.I.; Schürks, M.; Anttila, V.; de Vries, B.; Schminke, U.; Launer, L.J.; Terwindt, G.M.; van den Maagdenberg, A.M.J.M.; Fendrich, K.; Völzke, H.; Ernst, F.; Griffiths, L.R.; Buring, J.E.; Kallela, M.; Freilinger, T.; Kubisch, C.; Ridker, P.M.; Palotie, A.; Ferrari M.D.; Hoffmann, W.; Zee, R.Y.L.; Kurth, T. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat. Genet.*, **2011**, *43*(7), 695-699.
- [4] Pessia, M.; Hanna, M.G. Episodic ataxia type 1. In: Pagon, R.A., Bird, T.D., Dolan, C., Stephens K. editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; **1993-2010**, Feb 09.
- [5] Imbrici, P.; D'Adamo, M.C.; Grottesi, A.; Biscarini, A.; Pessia, M. Episodic ataxia type 1 mutations affect fast inactivation of K⁺ channels by a reduction in either subunit surface expression or affinity for inactivation domain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2011**, Feb 9 (in press).
- [6] Adelman, J.P.; Bond, C.T.; Pessia, M.; Maylie, J. Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. *Neuron*, **1995**, *15*, 1449-1454.
- [7] Rea, R.; Spauschus, A.; Eunson, L.H.; Hanna, M.G.; Kullmann, D.M. Variable K⁺ channel subunit dysfunction in inherited mutations of KCNA1. *J. Physiol.*, **2002**, *538*, 5-23.
- [8] Zuberi, S.M.; Eunson, L.H.; Spauschus, A.; De Silva, R.; Tolmie, J.; Wood, N.W.; McWilliam, R.C.; Stephenson, J.P.; Kullmann, D.M.; Hanna, M.G. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain*, **1999**, *122*, 817-825.
- [9] Eunson, L.H.; Rea, R.; Zuberi, S.M.; Youroukos, S.; Panayiotopoulos, C.P.; Liguori, R.; Avoni, P.; McWilliam, R.C.; Stephenson, J.B.; Hanna, M.G.; Kullmann, D.M.; Spauschus, A. Clinical, genetic, and expression studies of mutations in the potassium channel gene KCNA1 reveal new phenotypic variability. *Ann. Neurol.*, **2000**, *48*, 647-656.
- [10] Rajakulendran, S.; Schorge, S.; Kullmann, D.M.; Hanna, M.G. Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics*, **2007**, *4*, 258-266.
- [11] Griggs, R.C.; Moxley, R.T. 3rd; Lafrance, R.A.; McQuillen, J. Hereditary paroxysmal ataxia: response to acetazolamide. *Neurology*, **1978**, *28*, 1259-1264.
- [12] Mori, Y.; Friedrich, T.; Kim, M.S.; Mikami, A.; Nakai, J.; Ruth, P.; Bosse, E.; Hofmann, F.; Flockerzi, V.; Furuichi, T.; Mikoshiba, K.; Imoto, K.; Tanabe, T.; Numa, S. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature*, **1991**, *350*, 398-402.
- [13] Guida, S.; Trettel, F.; Pagnutti, S.; Mantuano, E.; Tottene, A.; Veneziano, L.; Fellin, T.; Spadaro, M.; Stauderman, K.; Williams, M.; Volsen, S.; Ophoff, R.; Frants, R.; Jodice, C.; Frontali, M.; Pietrobon, D. Complete loss of P/Q calcium channel activity caused by a CACNA1A missense mutation carried by patients with episodic ataxia type 2. *Am. J. Hum. Genet.*, **2001**, *68*, 759-764.
- [14] Jun, K.; Piedras-Renteria, E.S.; Smith, S.M.; Wheeler, D.B.; Lee, T.G.; Chin, H.; Adams, M.E.; Sheller, R.H.; Tsien, R.W.; Shin, H.S. Ablation of P/Q-type Ca²⁺ channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha1A-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 15245-15250.
- [15] Spacey, S.D.; Hildebrand, M.E.; Materek, L.A.; Bird, T.D.; Snutch, T.P. Functional implications of a novel EA2 mutation in the P/Q-type calcium channel. *Ann. Neurol.*, **2004**, *56*, 213-220.
- [16] Veneziano, L.; Guida, S.; Mantuano, E.; Bernard, P.; Tarantino, P.; Boccone, L.; Hisama, F.M.; Carrera, P.; Jodice, C.; Frontali, M.; Newly characterized 5' and 3' regions of CACNA1A gene harbour mutations associated with familial hemiplegic migraine and episodic ataxia. *J. Neurol. Sci.*, **2009**, *276*, 31-37.
- [17] Jeng, C.J.; Sun, M.C.; Chen, Y.W.; Tang, C.Y. Dominant-negative effects of episodic ataxia type 2 mutations involve disruption of membrane trafficking of human P/Q-type Ca²⁺ channels. *J. Cell Physiol.*, **2008**, *214*, 422-433.
- [18] Graves, T.D.; Imbrici, P.; Kors, E.E.; Terwindt, G.M.; Eunson, L.H.; Frants, R.R.; Haan, J.; Ferrari, M.D.; Goadsby, P.J.; Hanna, M.G.; van den Maagdenberg, A.M.; Kullmann, D.M. Premature stop codons in a facilitating EF-hand splice variant of CaV2.1 cause episodic ataxia type 2. *Neurobiol. Dis.*, **2008**, *32*, 10-15.
- [19] Riant, F.; Moutada, R.; Saugier-Verber, P.; Tournier-Lasserre, E. Large CACNA1A deletion in a family with episodic ataxia type 2. *Arch. Neurol.*, **2008**, *65*, 817-820.
- [20] Labrum, R.W.; Rajakulendran, S.; Graves, T.D.; Eunson, L.H.; Bevan, R.; Sweeney, M.G.; Hammans, S.R.; Tubridy, N.; Britton, T.; Carr, L.J.; Ostergaard, J.R.; Kennedy, C.R.; Al-Memmar, A.; Kullmann, D.M.; Schorge, S.; Temple, K.; Davis, M.B.; Hanna, M.G. Large-scale calcium channel gene rearrangements in episodic ataxia and hemiplegic migraine: implications for diagnostic testing. *J. Med. Genet.*, **2009**, *46*, 786-791.
- [21] Müllner, C.; Broos, L.A.M.; van den Maagdenberg, A.M.J.M.; Striessnig, J. Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R and V1696I alter Ca_v2.1 Ca²⁺ channel gating. Evidence for β -subunit isoform-specific effects. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 51844-51850.
- [22] Zhuchenko, O.; Bailey, J.; Bonnen, P.; Ashizawa, T.; Stockton, D.W.; Amos, C.; Dobyns, W.B.; Strambrony, S.H.; Zoghbi, H.Y.; Lee, C.C. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.*, **1997**, *15*, 62-69.
- [23] Matsuyama, Z.; Murase, M.; Shimizu, H.; Aoki, Y.; Hayashi, M.; Hozumi, I.; Inuzuka, T. A novel insertion mutation of acetazolamide-responsive episodic ataxia in a Japanese family. *J. Neurol. Sci.*, **2003**, *210*, 91-93.
- [24] Steckley, J.L.; Ebers, G.C.; Cader, M.Z.; McLachlan, R.S. An autosomal dominant disorder with episodic ataxia, vertigo, and tinnitus. *Neurology*, **2001**, *57*, 1499-1502.
- [25] Cader, M.Z.; Steckley, J.L.; Dymnt, D.A.; McLachlan, R.S.; Ebers, G.C. A genome-wide screen and linkage mapping for a large pedigree with episodic ataxia. *Neurology*, **2005**, *65*(1), 156-158.
- [26] Farmer, T.W.; Mustian, V.M. Vestibulocerebellar ataxia. A newly defined hereditary syndrome with periodic manifestations. *Arch. Neurol.*, **1963**, *8*, 471-480.
- [27] Damji, K.F.; Allingham, R.R.; Pollock, S.C.; Small, K.; Lewis, K.E.; Stajich, J.M.; Yamaoka, L.H.; Vance, J.M.; Pericak-Vance, M.A. Periodic vestibulocerebellar ataxia, an autosomal dominant ataxia with defective smooth pursuit, is genetically distinct from other autosomal dominant ataxias. *Arch. Neurol.*, **1996**, *53*(4), 338-344.
- [28] Escayg, A.; MacDonald, B.T.; Meisler, M.H.; Baulac, S.; Huberfeld, G.; An-Gourfinkel, I.; Brice, A.; LeGuern, E.; Moulard, B.; Chaigne, D.; Buresi, C.; Malafosse, A. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat. Genet.*, **2000**, *24*(4), 343-345.
- [29] Escayg, A.; De Waard, M.; Lee D.D.; Bichet, D.; Wolf, P.; Mayer, T. Johnston, J.; Baloh, R.; Sander, T.; Meisler, M.H. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel β_2 -subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am. J. Hum. Genet.*, **2000**, *66*, 1531-1539.
- [30] Jen, J.C.; Wan, J.; Palos, T.P.; Howard, B.D.; Baloh, R.W. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology*, **2005**, *65*(4), 529-534.
- [31] de Vries, B.; Mamsa, H.; Stam, A.H.; Wan, J.; Bakker, S.L.; Vanmolkot, K.R.; Haan, J.; Terwindt, G.M.; Boon, E.M.; Howard, B.D.; Frants, R.R.; Baloh, R.W.; Ferrari, M.D.; Jen, J.C.; van den Maagdenberg, A.M. Episodic ataxia associated with EAAT1 mutation C186S affecting glutamate uptake. *Arch. Neurol.*, **2009**, *66*, 97-101.

- [32] Kerber, K.A.; Jen, J.C.; Lee, H.; Nelson, S.F.; Baloh, R.W. A new episodic ataxia syndrome with linkage to chromosome 19q13. *Arch. Neurol.*, **2007**, *64*(5), 249-253.
- [33] Stovner, L.J.; Zwart, J.A.; Hagen, K.; Terwindt, G.M.; Pascual, J. Epidemiology of headache in Europe. *Eur. J. Neurol.*, **2006**, *13*, 333-345.
- [34] International Headache Society. The international classification of headache disorders: 2nd edition. *Cephalalgia*, **2004**, *24*, Suppl 1, 9-160.
- [35] Lempert, T.; Neuhauser, H.; Daroff, R.B. Vertigo as a symptom of migraine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2009**, *1164*, 242-251.
- [36] Boycott, H.E.; Wilkinson, J.A.; Boyle, J.P.; Pearson, H.A.; Peers, C. Differential involvement of TNF alpha in hypoxic suppression of astrocyte glutamate transporters. *Glia*, **2008**, *56*, 998-1004.
- [37] Dallas, M.; Boycott, H.E.; Atkinson, L.; Miller, A.; Boyle, J.P.; Pearson, H.A.; Peers, C. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J. Neurosci.*, **2007**, *27*(15), 3946-3955.
- [38] Biondi, D.M. Is migraine a neuropathic pain syndrome? *Curr. Pain Headache Rep.*, **2006**, *10*, 167-178.
- [39] Andreou, A.P.; Goadsby, P.J. Therapeutic potential of novel glutamate receptor antagonists in migraine. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2009**, *18*, 789-803.
- [40] Baloh, R.W.; Jacobson, K.; Fife, T. Familial vestibulopathy: a new dominantly inherited syndrome. *Neurology*, **1994**, *44*, 20-25.
- [41] Bahmad, F.; DePalma, S.R.; Merchant, S.N.; Bezerra, R.; Oliveira, C.A.; Seidman, C.E.; Seidman, J.G. Locus for familial migrainous vertigo disease maps to chromosome 5q35. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **2009**, *118*(9), 670-676.
- [42] Brantberg, K. Familial early-onset progressive vestibulopathy without hearing impairment. *Acta Otolaryngol.*, **2003**, *123*, 713-717.
- [43] Jen, J.C.; Wang, H.; Lee, H.; Sabatti, C.; Trent, R.; Hannigan, I.; Brantberg, K.; Halmagyi, G.M.; Nelson, S.F.; Baloh, R.W. Suggestive linkage to chromosome 6q in families with bilateral vestibulopathy. *Neurology*, **2004**, *63*, 2376-2379.
- [44] Perez-Garrigues, H.; Lopez-Escamez, J.A.; Perez, P.; Sanz, R.; Orts, M.; Marco, J.; Barona, R.; Tapia, M.C.; Aran, I.; Cenjor, C.; Perez, N.; Morera, C.; Ramirez, R. Time course of episodes of definitive vertigo in Meniere's disease. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2008**, *134*(11), 1149-1154.
- [45] Wangemann, P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J. Physiol.*, **2006**, *576*(Pt1), 11-21.
- [46] Vrabec, J.T. Genetic investigations of Meniere's disease. *Otolaryngol. Clin. N. Am.*, **2010**, *43*(5), 1121-1132.
- [47] Arweiler-Harbeck, D.; Horsthemke, B.; Jahnke, K.; Hennies, C. Genetic aspects of familial Meniere's disease. *Otol. Neurotol.*, **2011** (in press)
- [48] Birgerson, L.; Gustavson, K.H.; Stahle, J. Familial Ménière's disease. A genetic investigation. *Acta Otolaryngol. (Suppl)* **1984**, *412*, 665-70.
- [49] Morrison, A.W. On genetic and environmental factors in Ménière's disease. *Am. J. Otol.*, **1994**, *15*(1), 35-39.
- [50] Bernstein, J.M.; Shanahan, T.C.; Schaffer, M. Further observations on the role of the MHC genes and certain hearing disorders. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* **1996**, *116*, 666-671.
- [51] Fung, K.; Xie, Y.; Hall, S.F.; Lillierap, D.P.; Taylor, S.A. Genetic basis of Familial Ménière's disease. *J. Otolaryngol.*, **2002**, *31*(1), 1-4.
- [52] Morrison, A.W.; Johnson, K.J. Genetics (molecular biology) and Ménière's disease. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, **2002**, *35*(3), 497-516.
- [53] Frykholm, C.; Larsen, H.C.; Dahl, N.; Klar, J.; Rask-Andersen, H.; Friberg, U. Familial Ménière's disease in five generations. *Otol. Neurotol.*, **2006**, *27*, 681-6.
- [54] Morrison, A.W.; Bailey, M.E.; Morrison, G.A. Familial Ménière's disease: clinical and genetic aspects. *J. Laryngol. Otol.*, **2009**, *123*(1), 29-37.
- [55] Oliveira, C.A.; Messias, C.I.; Ferrari, I. Occurrence of familial Ménière's syndrome and migraine in Brasilia. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **2002**, *111*, 229-236.
- [56] Klar, J.; Frykholm, C.; Friberg, U.; Dahl, N. A. Meniere's disease gene linked to chromosome 12p12.3. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **2006**, *141B*, 463-467.
- [57] Gabrikova, D.; Frykholm, C.; Friberg, U.; Lahaes, S.; Entesarian, M.; Dahl, N.; Klar, J. Familial Meniere's disease restricted to 4.48 Mb on chromosome 12p12.3 by allelic and haplotype association. *J. Hum. Genet.*, **2010**, *55*(12), 834-837.
- [58] Hietikko, E.; Kotimäki, J.; Kentala, E.; Klockars, T.; Sorri, M.; Männikkö, M. Finnish familial Meniere disease is not linked to chromosome 12p12.3, and anticipation and cosegregation with migraine are not common findings. *Genet. Med.*, **2011**, *13*(5), 415-420.
- [59] Shearer, A.E.; DeLuca, A.P.; Hildebrand, M.S.; Taylor, K.R.; Gurlora, J. 2nd; Scherer, S.; Scheetz, T.E.; Smith, R.J. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, *107*(49), 21104-21109.
- [60] Lynch, M.; Cameron, T.L.; Knight, M.; Kwok, T.Y.; Thomas, P.; Forrest, S.M.; Giersch, A.B.; Briggs, R.J. Pyman, B.C. Structural and mutational analysis of antitiquin as a candidate gene for Meniere disease. *Am. J. Med. Genet.*, **2002**, *110*(4), 397-399.
- [61] Mhatre, A.N.; Jero, J.; Chiappini, I.; Bolasco, G.; Barbara, M.; Lalwani, A.K. Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res.*, **2002**, *170*(1-2), 59-69.
- [62] Fransén, E.; Verstreken, M.; Verhagen, W.I.; Wuyts, F.L.; Huygen, P.L.; D'Haese, P.; Robertson, N.G.; Morton, C.C.; McGuirt, W.T.; Smith, R.J.; Declau, F.; Van de Heyning, P.H.; Van Camp, G. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum. Mol. Genet.*, **1999**, *8*, 1425-1429.
- [63] Doi, K.; Sato, T.; Kuramasu, T.; Hibino, H.; Kitahara, T.; Horii, A.; Matsushiro, N.; Fuse, Y.; Kubo, T. Meniere's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, KCNE1 and KCNE3. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **2005**, *67*(5), 289-293.
- [64] Koo, J.W.; Oh, S.H.; Chang, S.O.; Park, M.H.; Lim, M.J.; Yoo, T.J.; Kim, C.S. Association of HLA-DR and type II collagen autoimmunity with Meniere's disease. *Tissue Antigens*, **2003**, *61*(1), 99-103.
- [65] Lopez-Escamez, J.A.; Vilchez, J.R.; Soto-Varela, A.; Santos-Perez, S.; Perez-Garrigues, H.; Aran, I.; Lopez-Nevo, M.A. HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Meniere's disease in southern European population. *Otol. Neurotol.*, **2007**, *28*(7), 891-895.
- [66] Teggi, R.; Lanzani, C.; Zagato, L.; Delli Carpini, S.; Manunta, P.; Bianchi, G.; Bussi, M. Gly460Trp alpha-adducin mutation as a possible mechanism leading to endolymphatic hydrops in Meniere's syndrome. *Otol. Neurotol.*, **2008**, *29*(6), 824-828.
- [67] Kawaguchi, S.; Hagiwara, A.; Suzuki, M. Polymorphic analysis of the heat-shock protein 70 gene (HSPA1A) in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol.*, **2008**, *128*(11), 1173-1177.
- [68] Lopez-Escamez, J.A.; Moreno, A.; Bernal, M.; Perez-Garrigues, H.; Santos-Perez, S.; Soto-Varela, A.; Aran, I.; Fernandez-Sanfrancisco, O.; Lopez-Nevo, A.; Lopez-Nevo, M.A. Poly (ADP- Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) longer alleles spanning the promoter region may confer protection to Bilateral Meniere's disease. *Acta Otolaryngol.*, **2009**, *129*(11), 1222-1225.
- [69] Lopez-Escamez, J.A.; Saenz-Lopez, P.; Acosta, L.; Moreno, A.; Gazquez, I.; Perez-Garrigues, H.; Lopez-Nevo, A.; Lopez-Nevo, M.A. Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease. *Laryngoscope*, **2010**, *120*(1), 103-107.
- [70] Lopez-Escamez, J.A.; Saenz-Lopez, P.; Gazquez, I.; Moreno, A.; Gonzalez-Oller, C.; Soto-Varela, A.; Santos, S.; Aran, I.; Perez-Garrigues, H.; Ibañez, A.; Lopez-Nevo, M.A. Polymorphisms of CD16A and CD32 Fgamma Receptors and Circulating Immunocomplexes in Meniere Disease: a case-control study. *BMC Med. Genet.*, **2011**, *12*: 2.
- [71] Gazquez, I.; Lopez-Escamez, J.A.; Moreno, A.; Campbell, C.A.; Meyer, N.C.; Carey, J.P.; Minor, L.B.; Gantz, B.J.; Hansen, M.R.; Della Santina, C.; Aran, I.; Soto-Varela, A.; Santos, S.; Batuecas, A.; Perez-Garrigues, H.; Lopez-Nevo, A.; Smith, R.J.H.; Lopez-Nevo, M.A. Functional variants in NOS1 and NOS2A are not associated with progressive hearing loss in Meniere's disease in a European Caucasian population. *DNA Cell Biol.*, **2011**, *30*, PMID: 21612410.
- [72] Usami, S.; Takahashi, K.; Yuge, I.; Ohtsuka, A.; Namba, A.; Abe, S.; Fransén, E.; Pathy, L.; Otting, G.; Van Camp, G. Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, **2003**, *11*, 744-748.

- [73] Sanchez, E.; Lopez-Escamez, J.A.; Lopez-Nevot, M.A.; Lopez-Nevot, A.; Cortes, R.; Martin, J. Absence of COCH mutations in patients with Meniere disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, **2004**, *12*, 75–78.
- [74] Campbell, C.A.; Della Santina, C.C.; Meyer, N.C.; Smith, N.B.; Myrie, O.A.; Stone, E.M.; Fukushima, K.; Califano, J.; Carey, J.P.; Hansen, M.R.; Gantz, B.J.; Minor, L.B.; Smith, R.J. Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Ménière disease in the caucasian population. *Am. J. Med. Genet. Part A*, **2010**, *152A*, 67-74.
- [75] Schork, N.J.; Murray, S.S.; Frazer, K.A.; Topol, E.J. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2009**, *19(3)*, 212–219.
- [76] Wong, K.K.; deLeeuw, R.J.; Dosanjh, N.S.; Kimm, L.R.; Cheng, Z.; Horsman, D.E.; MacAulay, C.; Ng, R.T.; Brown, C.J.; Eichler, E.E.; Lam, W.L. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am. J. Hum. Genet.*, **2007**, *80(1)*, 91–104.

MICA-STR A.4 Is Associated With Slower Hearing Loss Progression in Patients With Ménière's Disease

*†Irene Gazquez, †Antonia Moreno, ‡Ismael Aran, §Andres Soto-Varela,
§Sofia Santos, ||Herminio Perez-Garrigues, ¶Alicia Lopez-Nevot,
*Teresa Requena, †Miguel Angel Lopez-Nevot,
and *¶Jose Antonio Lopez-Escamez

*Otology and Neurotology Group CTS495, GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica–Pfizer/ Universidad de Granada/Junta de Andalucía; †Department of Immunology, Hospital Virgen de las Nieves, Granada; ‡Department of Otolaryngology, Hospital de Pontevedra, Pontevedra; §Division of Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela; ||Division of Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital La Fe, Valencia; and ¶Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain

Hypothesis: Immune response may influence hearing outcome in Ménière's disease (MD).

Background: Major histocompatibility complex class I chain–related A (MICA) encodes a highly polymorphic stress-inducible protein, which interacts with NKG2D receptor on the surface of NK, $\gamma\delta$ T cells and T CD8 lymphocytes. We investigated the association of MICA gene with hearing outcome in MD and its linkage disequilibrium (LD) with human leukocyte antigen (HLA)–B.

Methods: MICA short tandem repeat polymorphism (MICA-STR) was genotyped using a polymerase chain reaction-based method in a total of 302 Spanish patients with MD and 420 healthy controls. Genotyping of HLA-B was performed using polymerase chain reaction and detected with reverse sequence-specific oligonucleotide probe system in 292 patients and 1,014 controls.

Results: Hearing loss was associated with the duration of MD ($p = 0.001$). We found that MICA*A5 allele was significantly associated in the Mediterranean set ($P_c = 0.04$, odds ratio = 0.51

[95% confidence interval, 0.30–0.84]), but this finding was not replicated in the Galicia population. However, median time to develop hearing loss greater than 40 dB was 16 years (95% confidence interval, 9–23) for patients with the MICA*A.4 allele and 10 years (95% confidence interval, 9–11) for patients with another MICA-STR allele (log-rank test, $p = 0.0038$). We did not find statistical differences in the distribution of B locus between the MD and the control group. In the LD analysis, MICA*A5.1-HLA-B*07 (8.8%), MICA*A6-HLA-B*44 (8.3%), and MICA*A6-HLA-B*51 (8.3%) were the most common haplotypes, and the stronger LD was found for haplotypes MICA*A.4-HLA-B*18 ($r^2 = 0.41$) and MICA*A.4-HLA-B*27 ($r^2 = 0.29$).

Conclusion: The allelic variant MICA*A.4 is significantly associated with slower progression of hearing loss in patients with MD. This suggests that the immune response influence hearing level in MD. **Key Words:** Human leukocyte antigen—MICA gene—Microsatellite polymorphism—Vertigo. *Otol Neurotol* 33:223–229, 2012.

Ménière's disease (MD) is a chronic disorder affecting the inner ear characterized by recurrent episodes of

spontaneous vertigo, aural pressure, tinnitus, and sensorineural hearing loss (SNHL). Autoimmune cause has been proposed in the pathophysiology of MD because elevated autoantibody titers and a clinical improvement with steroid therapy is observed in some patients (1). The elevation of serum circulating immune complexes found in patients with MD suggests that circulating immune complexes may be involved in the pathophysiology of the disease, either as a direct cause of damage or as a product of an underlying autoimmune abnormality (2,3).

The human leukocyte antigen (HLA) class I and class II molecules have been described as genetic markers for

Address correspondence and reprint requests to Jose A. Lopez-Escamez, M.D., Ph.D., Otology and Neurotology Group CTS495, GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica–Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía, Avda de la Ilustración, 114, 18007 Granada, Spain; E-mail: antonio.lopezescamez@genyo.es

Miguel A. Lopez-Nevot and Jose A. Lopez-Escamez share positions. Financial Disclosure Information: This study was funded by a FIS PI10/0925 Research Project from ISCIII and EU Regional Development Funds (FEDER). J. A. L. E. was partially supported by ISCIII research grant INT09/229. The 3130 XL Genetics Analyzer was funded by grant IF06/37291 from the Ministry of Science.

many autoimmune diseases (4–7). For most of these diseases, however, it has not been possible to show the molecular mechanisms underlying disease association with particular HLA molecules. Hence, MD has been associated with HLA-B*27 (8), HLA-B*44, (9), HLA-B*13 (9), HLA-Cw*07 (10), HLA-DRB1*1602 (11), and HLA-DRB1*1101 (12) in different populations.

The major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) is located 46 Kb centromeric to the HLA-B gene. The MICA gene encodes a stress-inducible molecule with 3 extracellular domains, namely, $\alpha 1$ (encoded by exon 2), $\alpha 2$ (encoded by exon 3), and $\alpha 3$ (encoded by exon 4); a transmembrane (TM) segment (encoded by exon 5); and a carboxy-terminal cytoplasmic tail (encoded by exon 6) (13).

MICA gene displays a remarkable degree of nucleotide variation in exons 2, 3, and 4 and harbors a short tandem repeat polymorphism of (GCT)_n (4, 5, 6, or 9, abbreviated as MICA-STR) within exon 5. Additionally, the MICA*A5.1 allele presents a nucleotide insertion (G) between the second and third triplet repeats, resulting in a premature stop codon (14).

MIC genes are mainly expressed in gastrointestinal epithelium, endothelial cells, and fibroblasts. However, MIC transcripts have been observed in all the major organs except the brain. So far, MICA expression in the inner ear tissues has not been investigated. MICA acts as a ligand for natural killer (NK) cells, $\gamma\delta$ T cells, and $\alpha\beta$ CD8+ T cells, which express a common activating NK cell receptor NKG2D (15). MICA-NKG2D interaction seems to increase inflammatory cytokine production and proliferation of a certain subset of T cells.

MD is characterized by fluctuating SNHL in the first years, and most of patients progress to severe or profound deafness in the involved ear. However, there is no biological marker for hearing loss progression in patients with MD.

Several investigations have suggested an association between MICA gene and autoimmune diseases (16–18). Moreover, the MICA gene product could play a major role in the autoimmune process and hearing loss outcome. MICA gene polymorphisms could modulate immune pathways, which are complementary and synergistic to those modulated by the classical HLA class II genes. We study the association of MD with MICA-STR in exon 5 of MICA gene and the linkage with locus B in patients with MD.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Samples

The present study included a total of 302 patients with definite MD according to the diagnostic scale of the American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery (AAO-HNS) (19). Patients in the probable and possible categories for diagnosis of MD were excluded from this study. Group 1 consisted of 153 patients from southeast of Spain; Group 2 included 149 patients from Galicia. Patients with definite MD were recruited from otoneurology clinics at 5 referral centers from January 2007 to March 2011. The clinical variables studied in our series were as follows: sex, age, hearing stage, duration of the disease,

bilateral SNHL, age of onset, type of headache, history of autoimmune disease, smoking, Tumarkin crisis, and the functional scale of the AAO-HNS. Patients were followed with serial audiograms at each visit to monitor hearing loss from the initial diagnosis. A basic neurotologic examination including pure-tone audiometry, nystagmus in the primary position, gaze-evoked and head-shaking nystagmus, and standard caloric test was performed in all patients. Hearing staging was calculated in the audiogram obtained the day of inclusion for each patient with definite MD and was defined as the mean of 4-tone average of 0.5, 1, 2, and 3 kHz according to the AAO-HNS criteria: Stage 1, 25 dB or less; Stage 2, 26 to 40 dB; Stage 3, 41–70 dB; Stage 4, 75 dB or greater (19). A total of 420 control samples from the corresponding cities obtained from the Spanish DNA Biobank (<http://www.bancoadn.org>) were included as healthy controls (Table 1).

The study was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki for investigations with human beings. The ethical review board of the hospital approved the research protocol.

Genomic DNA were isolated from anticoagulant-treated peripheral blood mononuclear cells using the GenoVision M-48 robot (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and the MagAttract DNA Blood Mini M48 (192) kit from Qiagen. All patients and healthy individuals gave their informed consent for the study.

MICA Genotyping

MICA-STR at exon 5 of the MICA gene was analyzed in both groups using the method described by Ota et al. (20). Polymerase chain reaction (PCR) primers were MICA 5F 5'-CCT TTT TTT CAG GGA AAG TGC-3' and MICA 5R 5'-CCT TAC CAT CTC CAG AAA CTG C-3', which was labeled at the 5' end with 6-FAM. PCR products were electrophoresed in an ABI Prism 3100XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and their sizes were determined using the GeneMapper version 4.0 software (Applied Biosystems).

HLA Genotyping

Genotyping for HLA-B* was carried out in 292 of 302 patients with MD and 1,014 independent controls using DNA PCR amplification with sequence-specific oligonucleotide probes (Dyna RELI sequence-specific oligonucleotide HLA-B typing kit; Dynal Biotech, Bromborough, U.K.).

Statistical Analyses

Data were analyzed using the SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Allelic frequencies of the MICA polymorphism and locus B were obtained by direct counting. Statistical analysis was performed with the χ^2 test with Fisher's exact test,

TABLE 1. Baseline characteristics of case and control subjects

Variable	Southeast population		Northwest population	
	Ménière's disease	Control	Ménière's disease	Control
Subjects	153	276	149	144
Female sex (%)	53.5	51.4	52.3	51.4
Age (yr)				
Mean	55.2	38.8	55.1	37.2
Median	56	37	57.5	35.5
Range	15–88	21–64	12–79	16–64
Standard deviation	12.9	9.5	13.5	13.1

TABLE 2. Hearing stage stratified by time since the onset of the disease demonstrates hearing loss progression in patients with Ménière's disease (N = 304)

Duration of Ménière's disease (yr)	No. of patients	Hearing stage n (%)				p value
		1 (n = 17)	2 (n = 60)	3 (n = 157)	4 (n = 68)	
0-5	102	7 (6.9)	29 (28.7)	52 (51.5)	13 (12.9)	0.00153
6-10	92	7 (7.6)	18 (19.6)	51 (55.4)	16 (17.4)	
11-15	56	4 (7.1)	7 (12.5)	29 (51.2)	16 (28.6)	
16-20	26	0 (0)	3 (11.5)	14 (53.8)	9 (28.6)	
20-25	11	0 (0)	1 (9.1)	5 (45.5)	5 (45.5)	
>25	18	0 (0)	1 (5.6)	6 (33.3)	11 (23)	

and odds ratios and 95% confidence intervals were calculated to compare the observed frequencies between MD patients and controls. The p values were corrected, according to the Bonferroni method, for the number of comparisons made (5 for MICA alleles and 24 for HLA-B). p < 0.05 was considered statistically significant.

The haplotype frequencies of MICA-STR and locus B were calculated to determine the linkage disequilibrium (LD) using Haploview 4.2. software (<http://www.broadinstitute.org/haploview>). LD parameter (D) was calculated from 2 x 2 tables. D' parameter corresponds to D standardized. D' = 1 corresponds to complete disequilibrium. The time to reach hearing loss greater than 40 dB (hearing Stage 3 or 4) and the persistence of vertigo for each MICA-STR polymorphism or locus B was determined according to the Kaplan-Meier method. Survival curves were compared using the log-rank test.

RESULTS

This study was designed to investigate the polymorphism of MICA-STR in patients with MD. We analyzed the effect of MICA within 2 independent cohorts of Caucasians: Group 1 included 420 individuals (153 patients and 276 controls) from southeast of Spain; Group 2 in-

cluded 293 individuals (149 patients and 144 controls) from Galicia to replicate the results.

Hearing loss was stratified by time since the onset of the disease in our series, showing that hearing stage is associated with the duration of MD (p = 0.001, Table 2).

Five alleles of the MICA-STR in exon 5 were found in both groups: A4, A5, A5.1, A6, and A9. Because the frequencies of MICA-STR alleles in control subjects from southeast and northwest populations were not significantly different (p = 0.75), we pooled all data for further analyses. The MICA-STR allele displaying the highest frequency in both groups was A6 (34.1% and 38.2%, respectively). Patients with unilateral and bilateral MD had the same allelic distribution of frequencies, and therefore, they were considered as a single group of patients.

Table 3 shows the allele frequencies of MICA-STR in patients with MD and controls. We found that the allele MICA*A5 of the microsatellite is more common in controls (12.7%) than in patients with MD (6.9%) in Southeast group (Pc = 0.04, odds ratio = 0.51 [95% confidence interval, 0.30-0.84]). However, we could not replicate this findings in the Northwest set and meta-analysis of both sets showed that MICA*A5 is not associated with MD.

The distribution of frequencies of HLA-B did not differ between the northwest and southeast group, and all data were pooled. Moreover, HLA typing did not find any HLA-B* specificities significantly associated with MD (Table 4).

LD computations were performed in controls and patients for of HLA-B-MICA-STR haplotypes with a frequency of 1.5% or greater. As expected from the chromosomal positions of MICA and HLA-B*, significant positive disequilibria were observed between certain HLA-B* and MICA-STR alleles. We found 13 haplotypes in the control group, being the most common MICA*A6-HLA-B*44 (7.2%), MICA*A6-HLA-B*51 (7.4%), and MICA*A5.1-HLA-B*7 (6.5%). In patients

TABLE 3. Frequency of alleles at MICA-STR in patients with Ménière's disease and controls

Ménière's disease	Controls	Ménière's disease	Odds ratio (95% confidence interval)	p value	Corrected p
Southeast	n = 276	n = 153			
A.4	82 (14.9)	46 (15.0)	1.01 (0.68-1.50)	0.95	NS
A.5	70 (12.7)	21 (6.9)	0.51 (0.30-0.84)	0.008	0.04
A.5.1	141 (25.6)	72 (23.5)	0.86 (0.65-1.24)	0.50	NS
A.6	188 (34.1)	121 (39.5)	1.26 (0.95-1.69)	0.11	NS
A.9	70 (12.7)	46 (15.0)	1.22 (0.81-1.82)	0.34	NS
Northwest	n = 144	n = 149			
A.4	36 (12.5)	29 (9.7)	0.76 (0.45-1.27)	0.29	NS
A.5	38 (13.2)	35 (11.7)	0.88 (0.54-1.43)	0.60	NS
A.5.1*	68 (23.6)	82 (27.5)	1.23 (0.85-1.78)	0.28	NS
A.6	110 (38.2)	111 (37.2)	0.96 (0.69-1.34)	0.81	NS
A.9	36 (12.5)	41 (13.8)	1.12 (0.69-1.81)	0.65	NS
Ménière's disease overall	Controls n = 420	Ménière's disease n = 302	Odds ratio (95% confidence interval)	p value	Corrected p
A.4	118 (12.4)	75 (12.4)	0.86 (0.64-1.18)	0.36	NS
A.5	108 (12.9)	56 (12.9)	0.69 (0.49-0.97)	0.03	NS
A.5.1	209 (24.9)	154 (25.5)	1.03 (0.81-1.31)	0.80	NS
A.6	298 (35.5)	232 (38.4)	1.13 (0.91-1.41)	0.26	NS
A.9	106 (12.6)	87 (14.4)	1.16 (0.86-1.58)	0.33	NS

NS indicates not significant.

TABLE 4. Frequency of human leukocyte antigen locus B in patients with Ménière's disease and controls

Locus	Unilateral		Bilateral		Cases (n = 292)	Controls (n = 1014)	Odds ratio	p value
	Ménière's disease	Ménière's disease	Odds ratio	p value				
B*07	0.072	0.072	1.002	0.995	0.072	0.092	0.762	0.126
B*08	0.049	0.048	1.026	0.949	0.046	0.052	0.878	0.557
B*13	0.013	0.008	1.648	0.695	0.010	0.019	0.529	0.142
B*14	0.092	0.040	2.426	0.016	0.067	0.051	1.340	0.134
B*15	0.036	0.056	0.634	0.260	0.045	0.053	0.836	0.423
B*18	0.066	0.064	1.0026	0.940	0.067	0.089	0.730	0.084
B*27	0.020	0.052	0.366	0.037	0.033	0.037	0.875	0.610
B*35	0.095	0.060	1.646	0.128	0.084	0.103	0.797	0.171
B*37	0.023	0.012	1.934	0.524	0.017	0.010	1.664	0.184
B*38	0.033	0.024	1.379	0.538	0.029	0.028	1.055	0.848
B*39	0.013	0.020	0.651	0.738	0.017	0.014	1.244	0.556
B*40	0.039	0.036	1.097	0.837	0.039	0.034	1.181	0.498
B*41	0.023	0.020	1.151	0.812	0.021	0.013	1.554	0.205
B*44	0.167	0.204	0.783	0.266	0.182	0.151	1.247	0.074
B*45	0.008	0.016	0.406	0.417	0.010	0.016	0.627	0.292
B*49	0.049	0.040	1.241	0.604	0.048	0.031	1.570	0.050
B*50	0.030	0.036	0.814	0.668	0.031	0.030	1.043	0.880
B*51	0.095	0.108	0.868	0.615	0.103	0.090	1.154	0.361
B*52	0.016	0.024	0.678	0.555	0.019	0.015	1.236	0.549
B*53	0.016	0.012	1.372	0.735	0.014	0.016	0.866	0.717
B*55	0.007	0.004	1.644	1.000	0.007	0.010	0.659	0.443
B*56	0.003	—	—	1.000	0.002	0.002	0.694	1.00
B*57	0.023	0.032	0.711	0.513	0.027	0.025	1.091	0.763
B*58	0.013	0.012	1.094	1.000	0.012	0.013	0.899	0.802

with MD, we found the same distribution of frequencies, and no differences were found in MICA-STR and HLA-B haplotypes between cases and controls (Table 5).

Hearing loss data were available from all patients with MD. Seventeen were in Stage 1 (6.2%), 60 were in Stage 2 (19.7%), 157 in Stage 3 (51.7%), and 68 in Stage 4 (22.3%). Median time to develop hearing loss greater than 40 dB (Stage 3) was 16 years (95% confidence interval, 9–23) for patients with the MICA*A.4 allele and 10 years (95% confidence interval, 9–11) for patients with another MICA-STR allele (log-rank test, $p = 0.0038$; Fig. 1). Moreover, vertigo recurrences were observed in patients with the MICA*A.4 for 15 years (95% confidence interval, 7–23), but only 11 years (95% confidence interval, 10–12) in patients harboring another MICA-STR allele (log-rank test, $p = 0.048$; Fig. 2).

We also compared several clinical variables such as bilateral SNHL, age of onset, type of headache, history of autoimmune disease, smoking, Tumarkin crisis, and functional scale of the AAO-HNS in patients with or without the MICA*A.4 allele, but none of these clinical features was more commonly observed in any group (Table 6).

DISCUSSION

MD is a multifactorial disease, and probably, genetic, epigenetic, and environmental factors are contributing to its pathophysiology. We have found that allelic variants of MICA-STR in exon 5 may influence the time course of hearing loss of MD, and patients with the MICA*A.4 alleles have a slow progression in hearing loss.

TABLE 5. Haplotype frequency and linkage disequilibrium analysis between human leukocyte antigen-B and MICA-STR

Haplotype	Control group				Patients group			
	Haplotype frequency	D'	LOD	Corrected p	Haplotype frequency	D'	LOD	Corrected p
MICA*A.4-B*18	0.053	0.906	36.22	1.18×10^{-24}	0.042	0.829	17.51	2.64×10^{-13}
MICA*A.4-B*27	0.026	1.000	24.32	5.28×10^{-9}	0.023	0.864	9.35	3.30×10^{-7}
MICA*A.5-B*15	0.026	0.603	11.10	2.15×10^{-7}	0.023	0.390	3.56	1.36×10^{-5}
MICA*A.5-B*35	0.025	0.201	2.21	0.02	0.026	0.100	0.44	5.28×10^{-4}
MICA*A.5.1-B*7	0.065	0.764	22.02	2.02×10^{-13}	0.055	0.865	10.14	4.62×10^{-10}
MICA*A.5.1-B*8	0.029	0.679	6.92	5.94×10^{-6}	0.036	0.851	5.97	2.42×10^{-7}
MICA*A.5.1-B*35	0.015	1.000	4.07	0.01	0.015	0.002	0.00	NS
MICA*A.5.1-B*40	0.018	0.202	0.56	NS	0.023	0.283	0.61	0.06
MICA*A.6-B*44	0.072	0.442	4.69	6.16×10^{-5}	0.098	0.332	2.47	0.02
MICA*A.6-B*49	0.024	0.908	5.11	7.26×10^{-6}	0.034	0.825	3.89	6.6×10^{-4}
MICA*A.6-B*50	0.025	1.000	6.02	2.86×10^{-6}	0.028	0.657	2.01	0.02
MICA*A.6-B*51	0.074	0.865	15.54	1.87×10^{-14}	0.089	0.828	8.36	3.52×10^{-14}
MICA*A.9-B*35	0.024	0.340	6.85	0.02	0.019	0.353	3.53	NS
MICA*A.9-B*57	0.023	0.878	9.70	6.03×10^{-15}	0.021	0.896	5.59	2.86×10^{-7}

The LD analysis was restricted to HLA-B-MICA-STR haplotypes with observed frequencies of 1.5% or greater in controls.

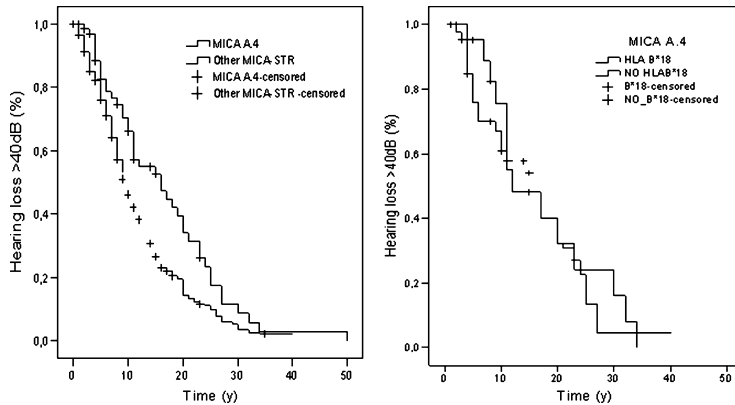


FIG. 1. MICA-STR is associated with slower hearing loss progression. A, Carriers of the allelic variant MICA A.4 reached stage 3 by median 6 years later than patients with another variant of MICA-STR (log-rank test, $p = 3.7 \times 10^{-3}$). B, Patients with haplotype MICA*A.4-HLAB*18 or MICA*A.4-with another HLAB locus did not show differences in hearing loss progression (log-rank test, $p = 0.67$).

Although diverse associations of HLA class I and II has been reported with MD in case-control studies across different ethnic groups (8–12), these findings has not been replicated in independent populations. Moreover, although several reasons may explain that replication studies do not confirm the initially observed association (selection bias, population stratification, or ethnic-specific variants) (21), HLA association studies require a large sample size because the number of alleles to compare for locus B or DR is very high. Our data include the largest series to study HLA-B in patients with MD and confirm no association of MD with locus B.

This lack of replication with the HLA genes has oriented our studies toward the analysis of the association of genes located within this region with polymorphic microsatellites, such as MICA-STR, which has shown LD with genes HLA-B (22). MICA is a member of the nonclassical class I family receptors that displays the greatest degree of polymorphism, and these polymorphisms are associated with a number of diseases related to NK activity (23). We have focused on MICA genes because increasing evidence exists that they may play an important role in the pathogenesis of several autoimmune diseases, such as celiac disease (16), systemic lupus erythematosus (17), and inflammatory bowel disease (18).

Bauer et al. (15) found that MICA binds NKG2D on $\gamma\delta$ T cells, $\alpha\beta$ CD8+ T cells, and NK cells. Engagement of NKG2D by MICA triggers NK cells and co-stimulates

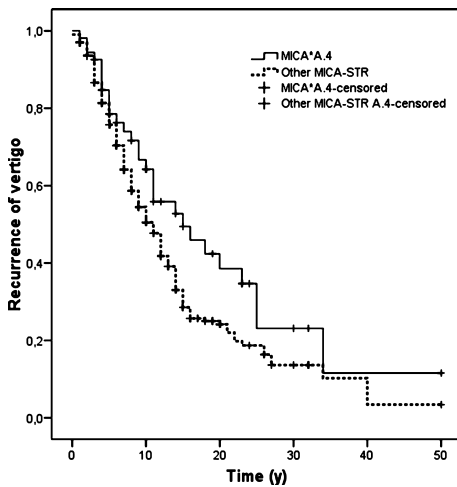


FIG. 2. MICA-STR A.4 allele and vertigo recurrence. Patients with the MICA*A.4 experienced vertigo by median 4 more years than patients with another MICA-STR allele (log-rank test, $p = 0.048$).

TABLE 6. Clinical variables in patients with Ménière's disease and the allele MICA-STR A.4 (2n = 604)

Variables	MICA A.4 (n = 75)	Other alleles (n = 529)	p value
Bilateral sensorineural hearing loss, n (%)	35 (47)	241 (48)	1.00
Age of onset (standard deviation)	45 (14)	46 (14)	0.80
Type of headache, n (%)			
Migraine	13 (48)	59 (37.6)	0.393
Tension-type headache	14 (52)	98 (62.4)	
History of autoimmune disease, n (%)	15 (28)	71 (17)	0.061
Smoking, n (%)	8 (16)	106 (26)	0.123
Tumarkin crisis, n (%)	11 (18)	93 (22)	0.617
Functional scale, n (%)			
1	10 (19)	106 (25)	0.271
2	18 (34)	166 (40)	
3	14 (26)	60 (14)	
4	6 (11)	34 (8)	
5	4 (7)	36 (9)	
6	1 (29)	13 (3)	

some $\gamma\delta$ T cells and antigen-specific CD8 $\alpha\beta$ T cells. Steinle et al. (24), investigated the interactions of NKG2D with its ligand and concluded that the pronounced differences in binding affinities of MICA alleles for NKG2D could have significant effects in NK cell activation and in the modulation of T-cell responses. In addition, because the MIC-NKG2D system has the ability to co-stimulate CD8 $\alpha\beta$ T-cell responses (25), interactions of high-affinity MICA alleles with NKG2D could play a role in precipitating or exacerbating autoimmune reactions. Moreover, the involvement of NKG2D and its ligands in autoimmune diseases has been shown in rheumatoid arthritis and diabetes (26).

MICA are induced by stress, acting as signals to alert NK cells and CD8 T lymphocytes through engagement of the NKG2D activating receptor. Spells of vertigo in MD are an acute stressing situation that could induce MICA expression on epithelial cells and fibroblasts in the inner ear, and recognition by NKG2D from NK and CD8 T cells would increase inflammation and/or tissue damage. Unfortunately, the expression of MICA at the inner ear has not been reported.

In this work, we studied the frequency of MICA-STR alleles in patients with MD and controls in Spain. There was no difference in MICA-STR distribution in controls from Galicia or Mediterranean population, suggesting that this polymorphism is homogeneous within Spanish population. However, we found that MICA*A5 was more common in controls than in patients in the Mediterranean cohort, suggesting differences with the Galicia set. Epigenetic or environmental factors triggering MD crisis can explain this findings. The MICA*A5 allele has been associated with ulcerative colitis (27) and with a worse progression of Type I diabetes mellitus (28) and multiple sclerosis (29).

MICA*A5 shows LD with HLA-B*15 and HLA-B*35. Because the frequencies of HLA-B*15 did not differ between cases and control and the frequencies of HLA-B*35 were 5% and 10%, respectively, it is possible that the haplotype MICA*A5-HLA-B35 may be a protection factor for MD, but our sample size is small to demonstrate a statistical association.

When MICA-HLA-B haplotype frequencies were compared between patients and controls, there were no statistically significant differences. However, MICA*A4 allele was associated with a longer time to develop hearing loss greater than 40 dB (16 yr versus 10 yr for another MICA allele). This suggests that the interaction between this allele and NKG2D receptor may determine less tissue damage in the inner ear. Despite the variability of hearing loss among patients, hearing loss progresses in most patients with MD, and the MICA*A4 allelic variant seems to be associated with a slower hearing loss progression.

Although the significance of high/low affinity for NKG2D receptor in terms of immune activation is not completely demonstrated, it is possible that the presence of MICA repeats might influence the interaction with this receptor; modify NK cells, $\gamma\delta$ T cells, and $\alpha\beta$ CD8+ T cells; and allow an exacerbated immune response. How-

ever, NK and T cells responses have not been investigated in MD.

CONCLUSION

Our data suggest that allelic variants of MICA-STR in exon 5 may influence the susceptibility and time course of hearing loss of MD in the Spanish population. A patent application number P201132013 has been submitted to the Spanish Patent and Trademark Office.

REFERENCES

- Gottschlich S, Billings PB, Keithley EM, Weisman MH, Harris JP. Assessment of serum antibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss and Ménière's disease. *Laryngoscope* 1995;105:1347-52.
- Brookes GB. Circulating immune complexes in Ménière's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:536-40.
- Ruckenstein MJ, Prasthoffter A, Bigelow DC, Von Feldt JM, Kolasinski SL. Immunologic and serologic testing in patients with Ménière's disease. *Otol Neurotol* 2002;23:517-20; discussion 520-1.
- Balsa A, Cabezon A, Orozco G, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R62.
- Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC, Knight JC. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes Immun* 2010;11:99-112.
- International MHC and Autoimmunity Genetics Network, Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, et al. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18680-5.
- Bergamaschi L, Leone MA, Fasano ME, et al. HLA-class I markers and multiple sclerosis susceptibility in the Italian population. *Genes Immun* 2010;11:173-80.
- Rawal SG, Thakkar KH, Ziai K, Santi PA, Djalilian HR. HLA-B27-associated bilateral Ménière disease. *Ear Nose Throat J* 2010;89:122-7.
- Yeo SW, Park SN, Jeon EJ, Lee HY, Pyo CW, Kim TG. Influence of human leukocyte antigen in the pathogenesis of Ménière's disease in the South Korean population. *Acta Otolaryngol* 2002;122:851-6.
- Melchiorri L, Martini A, Rizzo R, Berto A, Adinolfi E, Baricord OR. Human leukocyte antigen-A, -B, -C and -DR alleles and soluble human leukocyte antigen class I serum level in Ménière's disease. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002;548:26-9.
- Koyama S, Mitsuishi Y, Bibee K, Watanabe I, Terasaki PI. HLA associations with Ménière's disease. *Acta Otolaryngol* 2002;258:347-50.
- Lopez-Escamez JA, Vilchez JR, Soto-Varela A, et al. HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Ménière's disease in southern European population. *Otol Neurotol* 2007;28:891-5.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6259-63.
- Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;44:80-1.
- Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-9.
- Rueda B, Pascual M, López-Nevot MA, et al. Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:359-62.
- Gambelunghe G, Gerli R, Bocci EB, et al. Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:287-92.

18. López-Hernández R, Valdés M, Lucas D, et al. Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. *Hum Immunol* 2010;71:512-4.
19. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181-5.
20. Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, et al. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek an Italian. *Tissue Antigens* 1997;49:448-54.
21. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: Practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002;3:91-397.
22. Tian W, Li X-L, Wang F, et al. MICA-STR, HLA-B haplotypic diversity and linkage disequilibrium in the Hunan Han population of southern China. *Int J Immunogenet* 2006;33:241-5.
23. Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* 2010;16:97-106.
24. Steinle A, Li P, Morris DL, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001;53:279-87.
25. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;2:255-60.
26. Caillat-Zucman S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol* 2006;67:204-7.
27. Fdez-Morera JL, Rodrigo L, López-Vázquez A, et al. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003;64:816-22.
28. Gambelunghé G, Ghanderi M, Cosentino A, et al. Association of MHC class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with type I diabetes. *Diabetologia* 2000;43:507-14.
29. Fdez Morera JL, Tunon A, Rodríguez-Rodero S, et al. Clinical behavior of multiple sclerosis in modulated by the MHC class I chain-related gene A. *Tissue Antigens* 2006;67:409-14.

Functional Variants in *NOS1* and *NOS2A* Are Not Associated with Progressive Hearing Loss in Ménière's Disease in a European Caucasian Population

Irene Gazquez,^{1,2} Jose A. Lopez-Escamez,^{1,3} Antonia Moreno,² Colleen A. Campbell,⁴ Nicole C. Meyer,⁴ John P. Carey,⁵ Lloyd B. Minor,⁵ Bruce J. Gantz,⁴ Marlan R. Hansen,⁴ Charles C. Della Santina,⁵ Ismael Aran,⁶ Andres Soto-Varela,⁷ Sofia Santos,⁷ Angel Batuecas,⁸ Herminio Perez-Garrigues,⁹ Alicia Lopez-Nevot,¹⁰ Richard J.H. Smith,⁴ and Miguel A. Lopez-Nevot²

Hearing loss in Ménière's disease (MD) is associated with loss of spiral ganglion neurons and hair cells. In a guinea pig model of endolymphatic hydrops, nitric oxide synthases (NOS) and oxidative stress mediate loss of spiral ganglion neurons. To test the hypothesis that functional variants of *NOS1* and *NOS2A* are associated with MD, we genotyped three functional variants of *NOS1* (rs41279104, rs2682826, and a cytosine-adenosine microsatellite repeat in exon 1f) and the CCTTT repeat in the promoter of *NOS2A* gene (rs3833912) in two independent MD sets (273 patients in total) and 550 controls. A third cohort of American patients was genotyped as replication cohort for the CCTTT repeat. Neither allele nor genotype frequencies of rs41279104 and rs2682826 were associated with MD, although longer alleles of the cytosine-adenosine microsatellite repeat were marginally significant (corrected $p=0.05$) in the Mediterranean cohort but not in a second Galicia cohort. Shorter numbers of the CCTTT repeat in *NOS2A* were significantly more frequent in Galicia controls (OR = 0.37 [CI, 0.18–0.76], corrected $p=0.04$), but this finding could not be replicated in Mediterranean or American case-control populations. Meta-analysis did not support an association between CCTTT repeats and risk for MD. Severe hearing loss (>75 dB) was also not associated with any functional variants studied. Functional variants of *NOS1* and *NOS2A* do not confer susceptibility for MD.

Introduction

MÉNIÈRE'S DISEASE (MD) is an inner ear disorder characterized by episodes of vertigo lasting from minutes to hours and associated with sensorineural hearing loss, aural fullness or pressure, and tinnitus (MIM 156000). The hearing loss usually affects the low frequencies first, and in an animal model of endolymphatic hydrops (ELH), it is associated with loss of spiral ganglion neurons (SGNs), suggesting that neuronal apoptosis beginning at the apex may be the primary damage in MD (Merchant *et al.*, 2005; Momin

et al., 2010). Relevant to this pathophysiology is the observation that chronic stimulation of glutamate receptors of nerve afferents causes an *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated toxicity, which leads to oxidative stress in SGNs (Anne *et al.*, 2007; Bixentine *et al.*, 2008).

Nitric oxide (NO), a product of an NO synthase (NOS)-catalyzed reaction that converts L-arginine to citrulline, is important in promoting neuronal survival and plasticity (Calabrese *et al.*, 2007) and in controlling mitochondrial oxygen consumption (Pacher *et al.*, 2007). The genes *NOS1* (*nNOS*) and *NOS2A* (*iNOS*) code for two isoforms of NOS

¹Otology and Neurotology Group CTS495, GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica-Pfizer, Universidad de Granada, Junta de Andalucía, Granada, Spain.

²Department of Immunology, Hospital Virgen de las Nieves, University of Granada, Granada, Spain.

³Otology and Neurotology Group CTS495, Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain.

⁴Department of Otolaryngology, University of Iowa, Iowa City, Iowa.

⁵Departments of Otolaryngology—Head and Neck Surgery, Biomedical Engineering, and Neuroscience, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland.

⁶Department of Otolaryngology, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, Spain.

⁷Division of Otononeurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, Santiago, Spain.

⁸Department Otolaryngology, Hospital Universitario Salamanca, Salamanca, Spain.

⁹Division of Otononeurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital La Fe, Valencia, Spain.

¹⁰Otology and Neurotology Group CTS495, Department of Otolaryngology, Hospital Virgen de las Nieves, University of Granada, Granada, Spain.

NOS1 AND NOS2A GENES IN MÉNIÈRE'S DISEASE

3

TABLE 1. OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES USED FOR POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION

Name		Probes		Primers	
rs41279104	CCCTCCCAGGGGCAGGCTGGGAGGAGG[C/T]GGCTCTGCTGGGTGGGAGGCCAAG	Reverse			
rs2682826	CATGTTCCAGTGGTTTCATGCACCC[A/G]TGAGTTGCCCTTGTCGGCAAGAGAG	Forward			
NOS1 microsatellite	5'-GGACGCACCCGATGATGTAAG-3'				Forward
	5'-ATTACTCCCAACGCAGCAGA-3'				Reverse
rs3833912	5'-ACCCCTGGAAGCCTACAAC-3'				Forward
	5'-GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA-3'				Reverse

patient with definite MD was defined as the mean of four-tone average of 0.5, 1, 2, and 3 kHz according to the AAO-HNS criteria: stage 1, ≤ 25 dB; stage 2, 26–40 dB; stage 3, 41–70 dB; 4, stage 4, >75 dB (Monsell *et al.*, 1995).

Local institutional review boards of all participating institutions approved the study, and all patients gave informed consent to participate according to the Declaration of Helsinki.

NOS1 SNP genotyping

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood of patients and healthy controls using the Bio robot M-48 Workstation (Genovision) and the MagAttract DNA Blood Mini M48 (192) kit from Qiagen. A TaqMan 5' allelic discrimination assay using a custom TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems) was used to genotype rs41279104 and rs2682826, C_86363451_10C, and 15907244_10 with TaqMan probes obtained from Applied Biosystems. The TaqMan minor groove binder (MGB) probe sequences are shown in Table 1. Allele discrimination was performed using 10 ng of sample DNA in a 4 μ L reaction mixture containing 2.5 μ L TaqMan Universal polymerase chain reaction (PCR) mix (Applied Biosystems), 300 nM primers, and 200 nM TaqMan MGB probes (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of preincubation at 50°C for 120 s and denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of 92°C for 15 s and 60°C for 90 s. Amplification was performed in an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with continuous fluorescence monitoring.

NOS1 and NOS2A microsatellite genotyping

NOS1 Ex1f VNTR (CA repeats) genotyping was carried out by PCR using a primer labeled with fluorescent dye 6-carboxyfluorescein amino hexy (FAM). The frequency of the

length variant clusters mainly at the alleles 182/184, 192, and 200/202/204, and so we dichotomized the VNTR as short (180–196 repeats) and long (198–210 repeats), as previously described (Reif *et al.*, 2006). For NOS2A, samples were genotyped by PCR of the multiallelic CCTTT repeat (rs3833912). Forward and reverse primers are shown in Table 1. PCR aliquots (2 μ L) were mixed with 9.25 μ L formamide and 0.25 μ L of the internal size standard (GENESCAN-500 LIZ). Samples were analyzed by capillary electrophoresis in a 3130 XL Genetic Analyzer with Data Collection Software V3.0 (Applied Biosystems). Microsatellite alleles were assigned using the GeneMapper v4.0 software.

NOS2A promoter sequencing

The products from seven individuals were sequenced in both directions to confirm the number of repeats for accurate genotype assignment. The promoter region of *iNOS* was amplified with the same pairs of primers but with M13 tails using DNA from homozygous individuals. DNA sequencing was performed following the protocol of the VariantSeqR Resequencing System from Applied Biosystems with BigDye Terminators v3.1; M13 primers were analyzed by capillary electrophoresis on a 3130 XL Genetic Analyzer with the DNA Sequencing Analysis Software v5.2 (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Allele frequencies were compared across both groups by the χ^2 test with Fisher's exact test using SPSS Software (SPSS, Inc.). Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were calculated to compare the observed frequencies between cases and controls. Alleles of NOS1 Ex1f VNTR were grouped as either short or large, as previously described (Reif *et al.*, 2006). Probability values (*p*) were corrected for

TABLE 2. BASELINE CHARACTERISTICS OF CASE AND CONTROL SUBJECTS

Variable	Southeast Spain population		Northwest Spain population		European American population	
	MD	Control	MD	Control	MD	Control
Subjects	163	407	110	143	117	202
Female gender (%)	54.3	57.3	49.5	51.4	54.8	54.0
Age (years)						
Mean	55.8	38.1	55.3	37.2	56.4	53.8
Median	56	36	58	38.5	56.5	54
Range	15–88	21–64	12–79	18–64	32–84	32–84
SD	13.1	9.2	13.7	13.1	26.2	26

MD, Ménière's disease.

multiple testing. *p*-Values lower than 0.05 were considered statistically significant. The time to each hearing loss >70 dB (hearing stage 4) for each allelic variant was determined according to the Kaplan–Meier method. Survival curves were compared using the log-rank test.

Results

NOS1 variants

The characteristics of southeast and northwest Spanish cohorts and the American cohort are shown in Table 2. The rs41279104 (exon 1d), rs2682826 (exon 29), and Ex1f VNTR genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium. In controls,

genotype frequencies of rs41279104 and rs2682826 were not significantly different in either Mediterranean or Galicia cohorts (*p* = 0.43 and *p* = 0.56, respectively). There was also no difference in the genotype frequencies between Mediterranean or Galicia MD cases for either SNP (rs41279104 [*p* = 0.67] or rs2682826 (*p* = 0.92)). An analysis of pooled data was also not significant (Table 3).

The alleles of NOS1 Ex1f VNTR in exon 1f were distributed in a bimodal fashion with one peak for long (alleles K–Q; peak, allele N) and two peaks for short alleles (alleles C and H) (Fig. 2). Eight of 16 VNTR1 alleles observed in controls at a frequency greater than 1% accounted for 97% of total variation (C, 18.2%; D, 5.2%; H, 22.2%; I, 3.8%; L, 10%; M, 11.9%; N,

TABLE 3. DISTRIBUTION OF rs41279104 (EXON 1D) AND rs2682826 (EXON 29) GENOTYPES AND ALLELIC FREQUENCIES OF THE NOS1 GENE IN CONTROLS AND PATIENTS WITH MÉNIÈRE’S DISEASE

Cohort	rs41279104 (exon 1d)	Controls (%)	MD (%)	OR (95% CI)	Uncorrected <i>p</i> -value
Mediterranean	Genotype	<i>n</i> = 383	<i>n</i> = 159		
	GG	78.1	76.1	0.89 (0.58–1.38)	0.65
	GA	19.8	22.6	1.18 (0.75–1.85)	0.48
	AA	2.1	1.3	0.60 (0.12–2.84)	0.73
	Allele	2 <i>n</i> = 766	2 <i>n</i> = 318		
	G	88.0	87.4	0.95 (0.64–1.41)	
Galicia	Genotype	<i>n</i> = 137	<i>n</i> = 96		
	GG	81.8	81.3	0.96 (0.50–1.89)	1.00
	GA	17.5	15.6	0.87 (0.43–1.76)	0.73
	AA	0.7	3.1	4.38 (0.45–42.82)	0.31
	Allele	2 <i>n</i> = 274	2 <i>n</i> = 192		
	G	90.5	89.1	0.85 (0.46–1.57)	
Overall	Genotype	<i>N</i> = 520	<i>N</i> = 255		
	GG	79.0	78.0	0.94 (0.65–1.36)	0.78
	GA	19.2	20.0	1.05 (0.72–1.53)	0.85
	AA	1.8	2.0	1.14 (0.37–3.42)	0.78
	Allele	2 <i>n</i> = 1040	2 <i>n</i> = 510		
	G	88.7	88	0.94 (0.68–1.31)	
	A	11.3	12	1.06 (0.76–1.47)	0.74
Cohort	rs2682826 (exon 29)	Controls (%)	MD (%)	OR (95% CI)	Uncorrected <i>p</i> -value
Mediterranean	Genotype	<i>n</i> = 407	<i>n</i> = 163		
	CC	47.9	49.7	1.07 (0.74–1.54)	0.71
	CT	42.5	44.2	1.07 (0.74–1.54)	0.78
	TT	9.6	6.1	0.62 (0.30–1.27)	0.25
	Allele	2 <i>n</i> = 814	2 <i>n</i> = 326		
	C	69.2	71.8	1.13 (0.85–1.50)	
Galicia	Genotype	<i>n</i> = 141	<i>n</i> = 109		
	CC	46.8	52.3	1.25 (0.75–2.05)	0.44
	CT	40.4	40.4	0.99 (0.60–1.66)	1.00
	TT	12.8	7.3	0.54 (0.23–1.30)	0.21
	Allele	2 <i>n</i> = 282	2 <i>n</i> = 218		
	C	67.0	72.5	1.30 (0.88–1.91)	
Overall	Genotype	<i>N</i> = 548	<i>N</i> = 272		
	CC	47.6	50.7	1.13 (0.85–1.51)	0.42
	CT	42.0	42.6	1.03 (0.76–1.38)	0.88
	TT	10.4	6.7	0.61 (0.35–1.06)	0.09
	Allele	2 <i>n</i> = 1096	2 <i>n</i> = 544		
	C	68.6	72.1	1.18 (0.94–1.48)	
	T	31.4	27.9	0.85 (0.67–1.06)	0.15

All corrected *p*-values were not significant.

NOS1 AND NOS2A GENES IN MÉNIÈRE'S DISEASE

5

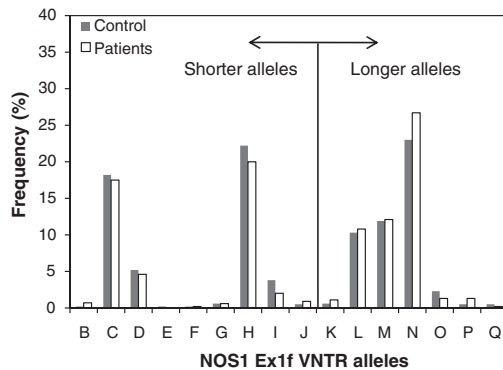


FIG. 2. Allelic distribution of the NOS1 promoter Ex1f variable number of tandem repeats in controls and patients with Ménière's disease. Alleles are arranged from short (B) to long (Q).

23%; O, 2.3%). When NOS1 Ex1f VNTR alleles were dichotomized as short (B–J) or long (K–Q) alleles, their frequencies were not significantly different in either Mediterranean or Galicia controls ($p=0.73$). There was also no difference in allelic frequencies of Ex1f VNTR between Mediterranean or Galicia MD cases ($p=0.14$). Again, with pooled data, no difference was found in genotype or allelic frequencies of Ex1f VNTR between cases and controls (Table 4).

NOS2A microsatellite

The CCTTT microsatellite was repeated 9–16 times, with significant differences in distribution frequency between the

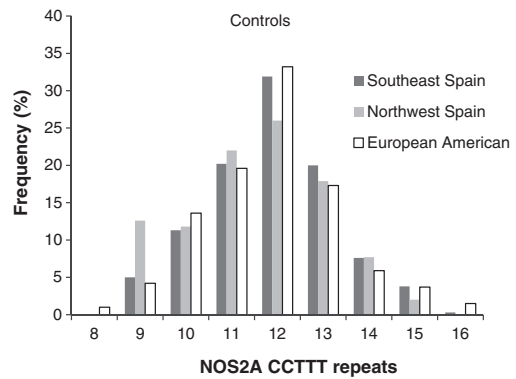


FIG. 3. Number of CCTTT repeats of the NOS2A promoter in controls from southeast (Mediterranean) and northwest (Celtic) of Spain showing differences in the frequency of the nine-repeat allele (Fisher test, corrected $p=0.04$).

Mediterranean and Galician controls (Fig. 3, corrected $p=0.04$). The number of repeats occurring most frequently were 11 (21%), 12 (30%), and 13 (19%); shorter microsatellites (nine repeats) in Mediterranean and Galicia controls were 5% and 13%, respectively (Table 5). We next compared CCTTT repeat frequency between patients with uni- and bilateral MD and found no difference in either Mediterranean ($p=0.21$) or Galicia populations ($p=0.99$).

In comparing cases and controls, we found that the nine-repeat allele was significantly more frequent in Galicia controls than patients (OR=0.37 [CI, 0.18–0.76], corrected $p=0.04$), although this finding was not replicated in either

TABLE 4. ALLELE FREQUENCIES OF VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS AT EXON 1F OF THE NOS1 GENE IN PATIENTS WITH MÉNIÈRE'S DISEASE AND CONTROLS FROM MEDITERRANEAN AND GALICIA SERIES

Cohort	Ex1fVNTR	Controls (%)	MD (%)	OR (95% CI)	Uncorrected p-value
Mediterranean	Allele	2n = 798	2n = 324		
	L	48.6	56.2	1.35 (1.04–1.76)	
	S	51.4	43.8	0.74 (0.57–0.96)	0.025 ^a
	Genotype	n = 399	n = 162		
	SS	27.8	18.5	0.59 (0.37–0.93)	0.02 ^b
Galicia	Allele	2n = 286	2n = 220		
	L	50.0	50.5	1.02 (0.72–1.45)	
	S	50.0	49.5	0.98 (0.69–1.40)	0.93
	Genotype	n = 143	n = 110		
	SS	25.9	21.8	0.80 (0.44–1.44)	0.55
Overall	Allele	2n = 1084	2n = 544		
	L	49.0	53.5	1.20 (0.97–1.47)	
	S	51.0	46.5	0.83 (0.68–1.02)	0.09
	Genotype	n = 542	n = 272		
	SS	27.3	19.9	0.66 (0.46–0.94)	0.02 ^b
	SL	47.4	53.3	1.27 (0.95–1.69)	0.12
	LL	25.3	26.8	1.08 (0.78–1.51)	0.67

^aCorrected $p=0.05$.

^bCorrected $p=0.06$.

TABLE 5. ALLELE FREQUENCIES OF CCTTT MICROSATELLITE rs3833912 IN THE NOS2A GENE IN PATIENTS WITH MÉNIÈRE'S DISEASE AND CONTROLS FROM MEDITERRANEAN AND GALICIA SERIES

Cohort	Number of repeats	Controls (%)	MD (%)	OR (95% CI)	Uncorrected p-value
Mediterranean		2n = 684	2n = 312		
	9	5.0	6.4	1.31 (0.74–2.31)	0.35
	10	11.3	16.7	1.58 (1.08–2.31)	0.02
	11	20.2	16.7	0.79 (0.56–1.13)	0.19
	12	31.9	30.4	0.94 (0.70–1.25)	0.65
	13	20.0	19.6	0.97 (0.69–1.36)	0.86
	14	7.6	7.4	0.97 (0.58–1.61)	0.90
15	3.8	2.9	0.75 (0.35–1.62)	0.47	
16	0.3	—	—	1.00	
Galicia		2n = 246	2n = 216		
	9	12.6	5.1	0.37 (0.18–0.76)	0.005 ^a
	10	11.8	12.5	1.07 (0.61–1.87)	0.82
	11	22.0	19.9	0.88 (0.56–1.39)	0.59
	12	26.0	24.1	0.90 (0.59–1.38)	0.63
	13	17.9	20.8	1.21 (0.76–1.92)	0.42
	14	7.7	13.4	1.85 (1.01–3.41)	0.05
15	2.0	3.7	1.85 (0.60–5.75)	0.28	
16	—	0.5	—	0.47	
American		2n = 404	2n = 234		
	8	1.0	0.9	0.87 (0.16–4.78)	0.80
	9	4.2	4.7	1.13 (0.52–2.46)	0.77
	10	13.6	15.8	1.18 (0.75–1.85)	0.45
	11	19.6	15.8	0.78 (0.51–1.20)	0.24
	12	33.2	32.9	1.00 (0.71–1.41)	0.94
	13	17.3	16.2	0.93 (0.61–1.44)	0.72
	14	5.9	8.1	1.41 (0.75–2.63)	0.29
	15	3.7	2.6	0.69 (0.26–1.80)	0.43
	16	1.5	2.6	1.76 (0.56–5.52)	0.33
17	—	0.4	—	0.78	
Overall		2n = 1334	2n = 762		
	9	6.1	5.5	0.89 (0.61–1.31)	0.56
	10	12.1	15.2	1.30 (1.01–1.68)	0.04 ^b
	11	20.3	17.3	0.82 (0.65–1.04)	0.10
	12	31.1	29.4	0.92 (0.76–1.12)	0.41
	13	18.8	18.9	1.01 (0.80–1.26)	0.94
	14	7.1	9.3	1.34 (0.97–1.85)	0.07
15	3.4	3.0	0.87 (0.52–1.45)	0.60	
16	0.6	0.9	1.54 (0.56–4.26)	0.40	

^aCorrected $p = 0.04$.^bCorrected $p = 0.32$.

the Mediterranean ($p = 0.35$) or American cohorts ($p = 0.77$). Pooled data from all patients also showed that the nine-repeat allele was not associated with MD ($p = 0.56$).

Hearing loss was assessed in a subgroup of 208 patients with MD. Median time to develop hearing loss >70 dB was 26 years (95% CI, 22–30) for patients with the allele A and 22 years (18–27) for patients with allele G (rs41279104, log-rank test, $p = 0.91$; Fig. 4A). There was no difference between patients with allele C or T of rs2682826 (24 years [18–30] and 22 years [19–25], respectively; log-rank test, $p = 0.81$; Fig. 4B).

The Ex1f VNTR of *NOS1* also did not confer susceptibility for hearing loss (short allele, severe hearing loss at 22 years [16–28]; long allele, severe hearing loss at 24 years [16–32]; log-rank test, $p = 0.52$) (Fig. 5A). Patients with the 9- or 10-repeat allele of the CCTTT microsatellite of *NOS2A* had a median time to stage 4 of 24 years (20–28); for patients with longer-repeat alleles, this time was 20 years (5–35) (log-rank test, $p = 0.17$) (Fig. 5B).

Discussion

Functional allelic variants have been investigated in MD by sequencing candidate genes or by case-control studies designed to identify associations conferring susceptibility to MD. The list of genes that have been studied includes anti-quitin (Lynch *et al.*, 2002), aquaporin 2 (Mhatre *et al.*, 2002), coagulation factor C homology (*COCH*) (Fransen *et al.*, 1999), potassium channel genes, *KCNE1* and *KCNE3* (Doi *et al.*, 2005), HLA class II genes (Koo *et al.*, 2003; Lopez-Escamez *et al.*, 2007), alpha-adducin (Teggi *et al.*, 2008), heat-shock protein 70 (Kawaguchi *et al.*, 2008), and *PTPN22* (Lopez-Escamez *et al.*, 2010). None of these genes has been associated with MD in independent population testing (Usami *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2010).

Our study investigated the association between functional variants of *NOS1* and *NOS2A* in Caucasians with MD. We were interested in these genes because NO protects against

NOS1 AND NOS2A GENES IN MÉNIÈRE'S DISEASE

7

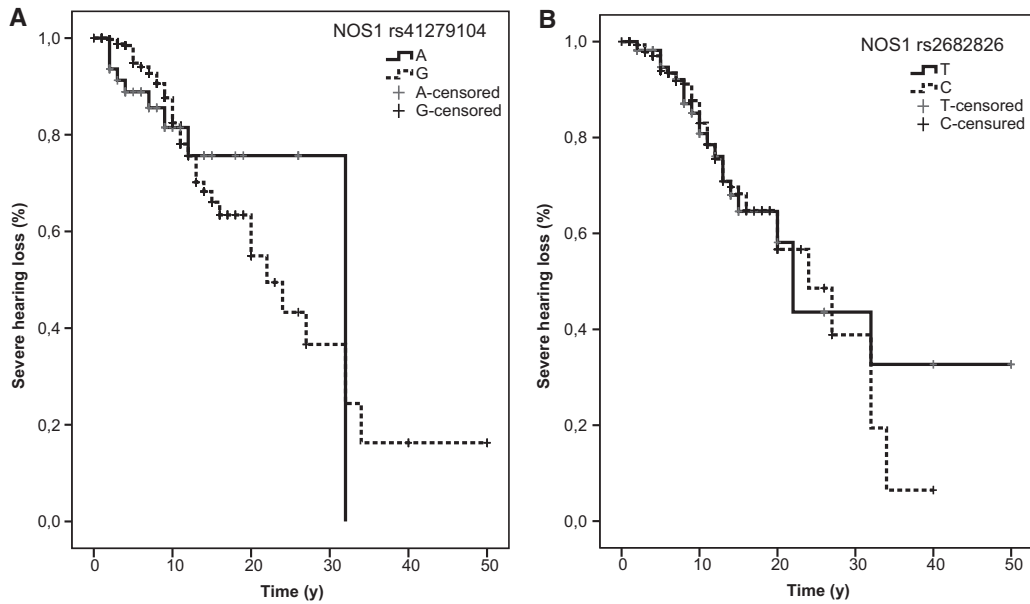


FIG. 4. SNPs of the *NOS1* gene are not associated with hearing loss progression. (A) Patients with allele A or G at rs41279104 displayed the same time to loss (75 dB) in the hearing level (log-rank test, $p = 0.91$). (B) Patients with allele C or T (rs2682826, log-rank test, $p = 0.81$).

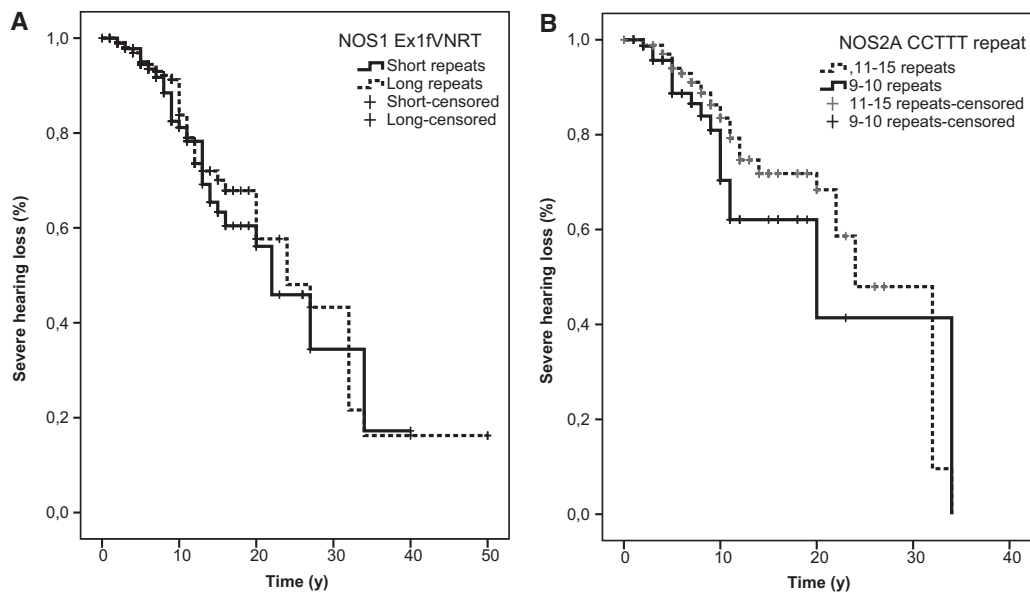


FIG. 5. Microsatellites of *NOS1* and *NOS2A* are not associated with hearing loss progression. (A) Carriers of the short alleles Ex1f variable number of tandem repeats of *NOS1* reached severe hearing loss at the same time as the patients with longer alleles (log-rank test, $p = 0.52$). (B) Patients with 9–10 or 11–16 repeats of CCTTT at *NOS2A* gene (log-rank test, $p = 0.17$).

NMDA-mediated neurotoxicity by S-nitrosylating the NR1 and NR2 subunits of the NMDA receptor, reducing the intracellular Ca^{2+} influx responsible for neuronal apoptosis (Calabrese *et al.*, 2007). NMDA-mediated excitotoxicity has been proposed as a key mechanism in the loss of SGNs in ototoxicity and ELH (Anne *et al.*, 2007; Ruel *et al.*, 2007). As high concentrations of glutamate induce apoptosis in SGNs, it is likely that hydrops-associated ionic disturbances in the cochlear nerve afferents lead to an increase of intracellular Ca^{2+} and NOS1 and NOS2A induction (Anne *et al.*, 2007; Bixenstine *et al.*, 2008).

The distribution of CCTTT alleles of NOS2A has been described in five ethnic populations and shows significant worldwide variation (Xu *et al.*, 2000a). Consistent with this finding, our data confirm that the 12-repeat allele is the most frequent in the Caucasian population (Xu *et al.*, 2000a; Motallebipour *et al.*, 2005). (Xu *et al.*, 2000; Motallebipour *et al.*, 2005). Of interest to us is the observation that this VNTR may function as an enhancer or as a spacer element affecting transcription (Kleinert *et al.*, 2003).

Two characteristics define enhancers and both are demonstrated by this microsatellite: the ability to bind nuclear factors (Motallebipour *et al.*, 2005) and the independence of orientation or distance to the transcription start site (Warpeha *et al.*, 1999). Increased spacing associated with more numerous repeats may create DNA flexibility, facilitating the interaction between flanking nuclear factors. Relevant to this possibility is the finding that the repeat sits approximately halfway between several NF- κ B binding sites upstream of the transcription start site (Taylor *et al.*, 1998), suggesting that the length of CCTTT could affect promoter interaction with nuclear factors or cytokines such as IFN- γ , IL-1 β , or TNF- α .

Short CCTTT alleles are associated with dementia with Lewy bodies, but not with Alzheimer's disease (Xu *et al.*, 2000b), and with migraine in the Han Chinese population, although additional studies are needed to replicate the latter finding in Caucasians (Jia *et al.*, 2011). However, we were unable to find any association of this repeat with MD.

In addition, we genotyped three functional variants of NOS1 that have been associated with Alzheimer's disease (Galimberti *et al.*, 2008) and behavioral disorders (Reif *et al.*, 2009). Again, we found no differences in these variants between MD cases and controls. Although other functional variants of NOS1 could be genotyped, there is no evidence that known structural variations in NOS1 are associated with MD.

Conclusions

Functional variants of NOS1 (rs41279104 at exon 1d, rs2682826 at exon 29, and a CA microsatellite at exon 1f) and a CCTTT repeat (rs3833912) at the promoter of NOS2A genes do not confer susceptibility for MD.

Acknowledgments

This study was funded by an FIS PI10/0920 Research Project from ISCIII. J.A.L.-E. was partially supported by ISCIII research grant INT09/229. The 3130 XL Genetics Analyzer was funded by grant IF06/37291 from Ministry of Science. This work was partially supported by the University of Iowa,

Department of Otolaryngology and the Research Fund of the American Otological Society (to R.J.H.S.).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Anne, S., Kisley, L.B., Tajuddin, S.T., Leahy, P., Alagramam, K.N., and Megerian, C.A. (2007). Molecular changes associated with the endolymphatic hydrops model. *Otol Neurotol* **28**, 834–841.
- Bixenstine, P.J., Maniglia, M.P., Vasanji, A., Alagramam, K.N., and Megerian, C.A. (2008) Spiral ganglion degeneration patterns in endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* **118**, 1217–1223.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**, 907–916.
- Boissel, J.P., Zelenka, M., Godtel-Armbrust, U., Feuerstein, T.J., Forstermann, U. (2003). Transcription of different exons 1 of the human neuronal nitric oxide synthase gene is dynamically regulated in a cell- and stimulus-specific manner. *Biol Chem* **384**, 351–362.
- Bredt, D.S. (2003). Nitric oxide signaling specificity—the heart of the problem. *J Cell Sci* **116**, 9–15.
- Bros, M., Boissel, J.P., Godtel-Armbrust, U., and Forstermann, U. (2006). Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences. *Genomics* **87**, 463–473.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., and Stella, A.M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* **8**, 766–775.
- Campbell, C.A., Della Santina, C.C., Meyer, N.C., Smith, N.B., Myrie, O.A., Stone, E.M., Fukushima, K., Califano, J., Carey, J.P., Hansen, M.R., Gantz B.J., Minor, L.B., and Smith R.J.H. (2010). Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Ménière disease in the caucasian population. *Am J Med Genet Part A* **152A**, 67–74.
- Campbell, C.D., Ogburn, E.L., Lunetta, K.L., Lyon, H.N., Freedman, M.L., Groop, L.C., Altshuler, D., Ardie, K.G., and Hirschhorn J.N. (2005). Demonstrating stratification in a European American population. *Nat Genet* **37**, 868–872.
- Cui, H., Nishiguchi, N., Yanagi, M., Fukutake, M., Mouri, K., Kitamura, N., Hashimoto, T., Shirakawa, O., and Hishimoto, A. (2010). A putative cis-acting polymorphism in the NOS1 gene is associated with schizophrenia and NOS1 immunoreactivity in the postmortem brain. *Schizophrenia Res* **121**, 172–178.
- Doi, K., Sato, T., Kuramasu, T., Hibino, H., Kitahara, T., Horii, A., Matsushiro, N., Fuse, Y., and Kubo, T. (2005). Meniere's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, KCNE1 and KCNE3. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **67**, 289–293.
- Fessenden, J.D., Altschuler, R.A., Seasholtz, A.F., and Schacht, J. (1999). Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the peripheral and central auditory system of the rat. *J Comp Neurol* **404**, 52–63.
- Fransen, E., Verstreken, M., Verhagen, W.L., *et al.* (1999). High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* **8**, 1425–1429.
- Galimberti, D., Scarpini, E., Venturelli, E., Strobel, A., Herterich, S., Fenoglio, C., Guidi, I., Scalabrini, D., Cortini, F., Bresolin,

- N., Lesh, K.P., and Reif, A. (2008). Association of a NOS1 promoter repeat with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **29**, 1359–1365.
- Glenn, C.L., Wang, W.Y., and Morris, B.J. (1999). Different frequencies of inducible nitric oxide synthase genotypes in older hypertensives. *Hypertension* **33**, 927–932.
- Gonzalez-Gay, M.A., Llorca, J., Sanchez, E., Lopez-Nevot, M.A., Amoli, M.M., Garcia-Porrúa, C., Ollier, W.E.R., and Martin, J. (2004). Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology* **43**, 1182–1185.
- Jia, S., Ni, J., Chen, S., Jiang, Y., Dong, W., Gao, Y. (2011). Association of the pentanucleotide repeat polymorphism in NOS2A promoter region with susceptibility to migraine in a Chinese population. *DNA Cell Biol* **30**, 117–122.
- Kawaguchi, S., Hagiwara, A., and Suzuki, M. (2008). Polymorphic analysis of the heat-shock protein 70 gene (HSPA1A) in Ménière's disease. *Acta Otolaryngol* **128**, 1173–1177.
- Kleinert, H., Schwarz, P.M., and Forstermann, U. (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* **384**, 1343–1364.
- Koo, J.W., Oh, S.H., Chang, S.O., Park, M.H., Lim, M.J., Yoo, T.J., and Kim, C.S. (2003). Association of HLA-DR and type II collagen autoimmunity with Ménière's disease. *Tissue Antigens* **61**, 99–103.
- Kun, J.F., Mordmuller, B., Lell, B., Lehman, L.G., Luckner, D., and Kremser, P.G. (1998). Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* **351**, 265–266.
- Lopez-Escamez, J.A., Saenz-Lopez, P., Acosta, L., Moreno, A., Gazquez, I., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., and Lopez-Nevot, M.A. (2010). Association of a functional polymorphism of TPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Ménière's disease. *Laryngoscope* **120**, 103–107.
- Lopez-Escamez, J.A., Vilchez, J.R., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Perez-Garrigues, H., Aran, I., and Lopez-Nevot, M.A. (2007). HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Ménière's disease in southern European population. *Otol Neurotol* **28**, 891–895.
- Lynch, M., Cameron, T.L., Knight, M., Kwok, T.Y., Thomas, P., Forrest, S.M., Giersch, A.B., Briggs, R.J., and Pyman, B.C. (2002) Structural and mutational analysis of antiquitin as a candidate gene for Ménière disease. *Am J Med Genet* **110**, 397–399.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* **15**, 323–350.
- Merchant, S.N., Adams, J.C., and Nadol, J.B. (2005). Pathophysiology of Ménière syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol Neurotol* **26**, 74–81.
- Mhatre, A.N., Jero, J., Chiappini, I., Bolasco, G., Barbara, M., and Lalwani, A.K. (2002) Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Ménière's disease. *Hear Res* **170**, 59–69.
- Michel, O., Hess, A., Su, J., Bloch, W., Stennert, E., and Addicks, K. (2000). Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the hydropic cochlea of guinea pigs. *Hear Res* **143**, 23–28.
- Momin, S.R., Melki, S.J., Alagramam, K.N., and Megerian, C.A. (2010). Spiral ganglion loss outpaces inner hair cell loss in endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* **120**, 159–165.
- Monsell, E.M., Balkany, T.A., Gates, G.A., Goldenberg, R.A., Meyerhoff, W.L., and House, J.W. (1995). Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* **113**, 181–185.
- Motallebipour, M., Rada-Iglesias, A., Jansson, M., and Wadelius, C. (2005). The promoter of inducible nitric oxide synthase implicated in glaucoma based on genetic analysis and nuclear factor binding. *Mol Vision* **11**, 950–957.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**, 315–424.
- Reif, A., Herterich, S., Strobel, A., Ehlis, A.C., Saur, D., Jacob, C.P., Wienker, T., Töpner, T., Fritzen, S., Walter, U., Schmitt, A., Fallgatter, A.J., and Lesch, K.P. (2006). A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function. *Mol Psychiatry* **11**, 286–300.
- Reif, A., Jacob, C.P., Rujescu, D., Herterich, S., Lang, S., Gutknecht, L., Baehne, C.G., Strobel, A., Freitag, C.M., Giegling, I., Romanos, M., Hartmann, A., Rösler, M., Renner, T.J., Fallgatter, A.J., Retz, W., Ehlis, A.C., and Lesch, P. (2009). Influence of functional variant of neuronal nitric oxide synthase on impulsive behaviors in humans. *Arch Gen Psychiatry* **66**, 41–50.
- Rife, T., Rasoul, B., Pullen, N., Mitchell, D., Grathwol, K., and Kurth, J. (2009). The effect of a promoter polymorphism on the transcription of nitric oxide synthase 1 and its relevance to Parkinson's disease. *J Neurosci Res* **87**, 2319–2325.
- Ruel, J., Wang, J., Rebillard, G., Eybalin, M., Lloyd, R., Pujol, R., and Puel, J.L. (2007). Physiology, pharmacology and plasticity at the inner ear hair cell synaptic complex. *Hear Res* **227**, 19–27.
- Sanchez, E., Lopez-Escamez, J.A., Lopez-Nevot, M.A., Lopez-Nevot, A., Cortes, R., and Martin, J. (2004). Absence of COCH mutations in patients with Ménière disease. *Eur J Hum Genet* **12**, 75–78.
- Saur, D., Seidler, B., Paehge, H., Schusdziarra, V., and Allescher, H.D. (2002). Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors. *J Biol Chem* **277**, 25798–25814.
- Saur, D., Vanderwinden, J.M., Seidler, B., Schmid, R.M., De Laet, M.H., and Allescher, H.D. (2004). Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 1662–1667.
- Shinkai, T., Ohmori, O., Hori, H., Nakamura, J. (2002). Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **7**, 560–563.
- Taylor, B.S., de Vera, M.E., Ganster, R.W., Wang, Q., Shapiro, R.A., Morris, S.M., Jr., Billiar, T.R., and Geller, G.A. (1998). Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* **273**, 15148–15156.
- Teggi, R., Lanzani, C., Zagato, L., Delli Carpini, S., Manunta, P., Bianchi, G., and Bussi, M. (2008). Gly460Trp alpha-adducin mutation as a possible mechanism leading to endolymphatic hydrops in Ménière's syndrome. *Otol Neurotol* **29**, 824–828.
- Usami, S., Takahashi, K., Yuge, I., Ohtsuka, A., Namba, A., Abe, S., Fransen, E., Patthy, L., Otting, G., and Van Camp, G. (2003). Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Ménière's disease. *Eur J Hum Genet* **11**, 744–748.
- Warpeha, K.M., Xu, W., Liu, L., Charles, I.G., Patterson, C.C., Ah-Fat, F., Harding, S., Hart, P.M., Chakravarthy, U., Hughes,

- A.E. (1999). Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)_n repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J* **13**, 1825–1832.
- Xu, W., Humphries, S., Tomita, M., Okuyama, T., Matsuki, M., Burgner, D., Kwiatkowski, D., Liu, L., and Charles, I.G. (2000a). Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assessment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease. *Nitric Oxide* **4**, 379–383.
- Xu, W., Liu, L., Emson, P., Harrington, C.R., McKeith, I.G., Perry, R.H., Morris, C.M., and Charles, I.G. (2000b). The CCTTT polymorphism in the NOS2A gene is associated with dementia with Lewy bodies. *Neuroreport* **11**, 297–299.

Address correspondence to:
Jose A. Lopez-Escamez, M.D., Ph.D.
Otology and Neurotology Group CTS495
GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica–Pfizer
Universidad de Granada, Junta de Andalucía
Avda de la Ilustración, 114
18007 Granada
Spain

E-mail: antonio.lopezescamez@genyo.es

Received for publication February 24, 2011; received in revised form March 4, 2011; accepted March 7, 2011.

Association of a Functional Polymorphism of *PTPN22* Encoding a Lymphoid Protein Phosphatase in Bilateral Meniere's Disease

Jose A. Lopez-Escamez, MD, PhD; Pablo Saenz-Lopez, MD; Lourdes Acosta, MD, PhD; Antonia Moreno; Irene Gazquez, MD; Herminio Perez-Garrigues, MD, PhD; Alicia Lopez-Nevot, MD, PhD; Miguel A. Lopez-Nevot, MD, PhD

Objectives/Hypothesis: Bilateral Meniere's disease (BMD) is a severe disease that usually results in bilateral severe or profound sensorineural hearing loss and chronic disequilibrium with loss of vestibular function. We examined single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *PTPN22* and *CTLA4* genes in Caucasian patients with BMD to assess the possible association between these polymorphism and the predisposition and clinical expression of this disease.

Study Design: A case control study.

Methods: The functional protein tyrosine phosphatase type 22 (*PTPN22*) SNP (rs2476601, 1858C/T) and *CTLA4* SNP (rs231775, 49A/G) were analyzed in 52 patients with BMD and 348 healthy controls by a TaqMan 5' allelic discrimination assay. Data were analyzed by a χ^2 test with Fisher exact test.

Results: No association was found between the +49A/G *CTLA4* genotype and BMD patients. However, the heterozygote *PTPN22* 1858C/T genotype was present at a significantly higher frequency in BMD patients than in controls (odds ratio = 2.25, 95% confidence interval: 1.09–4.62; $P = .04$).

Conclusions: These results suggest that the *PTPN22* 1858C/T genotype may confer differential susceptibility to BMD in the Spanish population and support an autoimmune etiology for BMD.

Key Words: Meniere's disease, *PTPN22* gene, *CTLA4* gene, vestibular system, autoimmunity.
Laryngoscope, 000:000–000, 2009

INTRODUCTION

Bilateral Meniere's disease (BMD) is a severe disease affecting the inner ear characterized by attacks of vertigo associated with hearing loss, usually preceded by tinnitus and aural fullness, leading to bilateral severe or profound sensorineural hearing loss with chronic disequilibrium. Although the cause of Meniere's disease (MD) (MIM 156000) is unknown, an immune mediated mechanism has been posited in the pathophysiology of MD,¹ because elevated autoantibodies titters and a clinical improvement with steroid therapy is observed in some patients with MD.² The elevation of levels of serum circulating immune complexes (CIC) found in patients with MD suggests that CICs may be involved in the pathogenesis of this disease, either as a direct cause of damage, or as a product of an underlying autoimmune abnormality.^{3,4}

The T cell regulatory gene encoding the cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (*CTLA4*) has been consistently associated with autoimmunity.⁵ *CTLA4* is a homologue of CD28 and binds the CD80/86 ligands of T cells. Whereas the CD28 ligand interaction plays a critical role in increasing and maintaining the T cell response initiated through engagement of the T cell receptor (TCR), the *CTLA4* ligand interaction has an inhibitory effect on T cell activation and might contribute to peripheral tolerance. *CTLA4* single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the gene have consistently been found to be associated with Graves' disease (GD),⁵ type 1 diabetes (T1D),⁵ autoimmune hypothyroidism (AIH),⁶ systemic lupus erythematosus (SLE),⁷ and Addison's disease.⁸ Several polymorphisms have been described in *CTLA4*, including –1722T/C and –319C/T, both of which are located within the promoter region, +49A/G in exon 1 (rs 231775),⁹ a microsatellite (AT)_n

From the Otolaryngology and Neurotology Group, Departments of Research and Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería (J.A.L.-E., L.A., I.G.); the Department of Immunology, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada (P.S.-L., A.M., M.A.L.-N.); the Division Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital La Fe, Valencia (H.P.-G.); and the Otolaryngology and Neurotology Group, Department of Otolaryngology, Hospital Virgen de las Nieves, Granada (A.L.-N.), Spain.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication June 23, 2009.

This work was supported by the research project PI 07/0035 from Instituto de Salud Carlos III.

Send correspondence to Jose A. Lopez-Escamez, MD, Otolaryngology and Neurotology Group CTS495, Departments of Research & Otolaryngology, Hospital de Poniente, Ctra de Almerimar s/n, 04700 El Ejido, Almería, Spain. E-mail: jalopez@cajamar.es

DOI: 10.1002/lary.20650

polymorphism, and a CT60A/G, both of which are within the 3'-untranslated region.

Phosphorylation of protein tyrosine kinases is mediated by protein tyrosine phosphatases (PTPs). Many PTPs play a negative role in TCR signalling, including lymphoid tyrosine phosphatase (LYP), a protein encoded by the *PTPN22* gene, expressed in the cytosol and nucleus of T cells.¹⁰ LYP is a strong negative regulator of T cell activation, either independently or through binding to a variety of adaptor molecules including c-Cbl, Csk kinase and Grb2. *PTPN22* is expressed primarily in T cells, B cells, monocytes, neutrophils, dendritic cells, and natural killer cells, which raise the possibility that the association of *PTPN22* with autoimmune diseases like rheumatoid arthritis (RA),¹¹ could also be a result of functional changes in these cells.

More recently, LYP has been involved in several autoimmune diseases including T1D, GD, SLE, AIH and RA.^{11,12} An SNP has been identified within *PTPN22* at position 1858 in codon 620 that results in an Arg to Trp (C to T) shift, and this change disrupts interaction between LYP and Csk kinases, disinhibiting T cell activation,⁸ and perhaps thereby increasing susceptibility to autoimmune disease.⁹ In vitro experiments have shown that the T allele of *PTPN22* bind less efficiently to Csk than the C allele does, suggesting that T cells expressing the T allele may be hyper-responsive, and consequently, individuals carrying T allele may be prone to autoimmunity.^{11,13}

Both of these two genes (*CTLA4* and *PTPN22*) encode molecules that are integral to the immune system and are actively involved in the process of T cell activation.¹⁴ The purpose to this study is to investigate the association of the *CTLA4* +49A/G and *PTPN22* 1858T SNPs in BMD patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

We analyzed 52 patients with BMD and 348 healthy volunteer donors. All patients were diagnosed according to the diagnostic scale for MD of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (AAO-HNS).¹⁵ Three centers recruited patients for this study: Hospital La Fe from Valencia, Hospital Virgen de las Nieves from Granada, and Hospital de Poniente from El Ejido, Almeria. The subject's informed consent was obtained to participate in the study according to the Declaration of Helsinki, and the local institutional ethics review board approved the study. The clinical features of patients with BMD are shown in Table I. Patients with unilateral MD or probable BMD, according to the AAO-HNS were excluded.

Genotyping

Total genomic DNA was automatically isolated from peripheral blood of patients and healthy controls using the Genovision M-48 robot (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and the MagAttract DNA Blood Mini M48 (192) kit from Qiagen.

Genotyping of +49A/G *CTLA4* (rs231775) was performed using a TaqMan 5' allelic discrimination assay by a custom TaqMan SNP Genotyping Assay method (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers and TaqMan probes were obtained

TABLE I.
Demographics and Clinical Characteristics in 52 Patients with Bilateral MD.

Variables	Bilateral MD	
Age, mean \pm SD	57 \pm 10	
Sex, women (%) / men (%)	32 (61) / 20 (38)	
Hearing loss at diagnosis, pure tone average, mean \pm SD	Left	Right
	61.6 \pm 24.8	54.5 \pm 20.4
Headache, n (%)	29 (56)	
Psychiatric disorder, n (%)	18 (35)	
Cardiovascular disease, n (%)	20 (38)	
Osteoarticular disease, n (%)	21 (50)	
Hearing stage, n (%)*		
1	0	
2	2 (4)	
3	30 (58)	
4	20 (38)	
Time-course (mo.), mean \pm SD	108 \pm 89	
Class, n (%)		
A	23 (44)	
B or C	29 (56)	
Functional scale, n (%)		
1	9 (17)	
2	12 (23)	
3	14 (27)	
4	0	
5	14 (27)	
6	3 (6)	
Sodium-free diet, n (%)	49 (94)	
Drug therapy for MD, n (%)	38 (73)	

*Hearing stage calculated for the worst ear in bilateral MD. MD = Meniere's disease; SD = standard deviation.

from Applied Biosystems. The TaqMan minor groove binder (MGB) probe sequences were 5'-GGCACAAGGCTCAGCTGAA CCTGGCT[A/G]CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT. The first probe (A) was labelled with the fluorescent dye VIC and the second (G) with FAM.

Samples were genotyped for *PTPN22* 1858C/T variants (rs2476601) with a TaqMan 5' allelic discrimination Assay-by-Design method (Applied Biosystems), as previously described.¹⁶ The primers sequences were 5'-CCAGCTCCTC AACCACAATAAATG (forward) and 5'-CAACTGCTCCAAGGA TAGATGATGA (reverse), and the TaqMan MGB probes sequences were 5'-CAGGTGTCC[A/G]TACAGG. The probes were labelled with VIC and FAM, respectively. Allelic discrimination using TaqMan was performed using 10 ng of sample DNA in a 25 μ L reaction containing 12.5 μ L TaqMan Universal polymerase chain reaction mix (Applied Biosystems) 300 nM primers, and 200 nM TaqMan MGB probes (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of preincubation at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes; and cycling for 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. Amplifications were performed in an ABI Prism 7750 machine (Applied Biosystems) for continuous fluorescence monitoring.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, IL). For association studies, a χ^2 test with Fisher exact

TABLE II.
Frequency of CTLA4 Alleles and Genotypes Among BMD Patients and Healthy Controls.

	Bilateral MD N = 52 (%)	Controls N = 348 (%)	OR (95% CI)	P Value
CTLA4 Genotype				
A/A	30 (57.7)	184 (52.1)	1.21 (0.67–2.19)	.62
A/G	21 (40.4)	153 (43.7)	0.86 (0.30–1.56)	.74
G/G	1 (1.9)	11 (3.1)	0.60 (0.07–4.76)	1.00
Allele	2n = 104 (%)	2n = 696 (%)	1.25 (0.76–2.07)	.45
A	82 (78.8)	521 (74.9)		
G	22 (21.2)	175 (25.1)		

BMD = bilateral Meniere's disease, MD = Meniere's disease; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

test was performed. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated to compare the observed frequencies between patients with BMD and their controls. *P* values <.05 were considered significant.

RESULTS

Our cohort showed a high prevalence of headache and osteoarticular disease, which could be symptoms of an underlying autoimmune disease. Thirty-four of 52 patients were tested for antinuclear antibodies (ANA) by indirect immunofluorescence, but only 4/34 (11.7%) had positive titers (2 cases at 1/160, one at 1/320, and another at 1/640, respectively).

Table II lists the allelic distribution of +49A/G *CTLA4* polymorphism in patients with BMD and controls. The allelic distribution in controls was similar to that obtained in other Caucasian populations. After comparing patients with the control population, we found no significant deviation in the distribution of the alleles or genotypes of +49A/G polymorphism.

Table III shows the allele and genotype frequencies of *PTPN22* polymorphism in patients with BMD and healthy subjects. The CT genotype was significantly observed at a higher frequency in BMD patients than in controls (*P* = .04; OR 2.25 [95% CI, 1.09–4.62]), whereas the CC genotype was less frequent in BMD patients than in controls (*P* = .05; OR 0.46 [95% CI, 0.22–0.94]), and the TT genotype is visually nonexistent. Marginal differences were also observed when allele frequencies are compared, with the T allele being present at a higher frequency in BMD patients (*P* = .06; OR 1.98 [95% CI, 1.01–3.89]).

We have studied the association of *PTPN22* polymorphism with clinical parameters. However, we did not find any association with sex, age of onset of MD, time course, headache, or severity of disease such as hearing loss, frequency of vertigo, or AAO-HNS functional scale (all *P* > .05).

DISCUSSION

Meniere's disease is a multifactorial disease, and population studies are necessary to search for risk alleles. It has long been speculated that MD might be an immune-mediated condition. So, antiheat shock protein 70 antibodies, tumor necrosis factor alpha, ANA, anti-phospholipid antibodies, and erythrocyte sedimentation rate have been studied for possible association with autoimmunity in MD.¹⁷ Despite the many unique clinical and serological features associated with specific autoimmune diseases, the frequent overlap of these conditions in individuals or families, coupled with growing evidence that different autoimmune diseases share susceptibility loci, predict commonalities in their genetic etiologies.¹² This prediction is borne out by studies showing that susceptibilities to T1D, RA, SLE, GD, and other autoimmunity disorders are associated with functional polymorphisms in *CTLA4* and *PTPN22*.

In this work, we investigated for the first time the role of +49A/G *CTLA4* polymorphisms in BMD susceptibility, and no evidence of association was found. The relevance of *CTLA4* in the counter-regulation of CD28 T cell antigen receptor activation of T cells is well established¹⁸; however, the molecular basis of the interactions between *CTLA4* and CD28 is uncertain. *CTLA4*, by

TABLE III.
Frequency of PTPN22 Alleles and Genotypes Among BMD Patients and Healthy Controls.

	Bilateral MD N = 52 (%)	Controls N = 348 (%)	OR (95% CI)	P Value
PTPN22 Genotype				
T/T	0	1 (0.3)		
C/T	12 (23.1)	41 (11.8)	2.25 (1.09–4.62)	.04
C/C	40 (76.9)	306 (87.9)	0.46 (0.22–0.94)	.05
Allele	2n = 104 (%)	2n = 696 (%)	1.98 (1.01–3.89)	.06
T	12 (11.5)	43 (6.2)		
C	92 (88.5)	653 (93.8)		

BMD = bilateral Meniere's disease, MD = Meniere's disease; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

means of its ligand-binding domain, may compete with CD28 for the receptors (CD80 and CD86) that they share. *CTLA4* might also deliver a negative signal to each T cell by inhibiting the TCR signalling complex, an activity that would not necessarily depend on ligand binding.⁵ Cell surface expression of *CTLA4* is influenced by polymorphisms in its sequence. The G allele at position +49 of exon 1 of *CTLA4* gene affects the *CTLA4* function, and was correlated with a higher risk of various autoimmune diseases, including GD, T1D, and HT.¹⁹ However, our analyses of the +49A/G *CTLA4* SNP showed no allelic or genotypic association with BMD. This lack of association was also observed with vitiligo,²⁰ RA,²¹ and inflammatory bowel disease.²²

Protein tyrosine phosphatases are critical regulators of T cell signal transduction. In conjunction with protein tyrosine kinases, PTPs regulate the reversible phosphorylation of tyrosine residues, and thereby play important roles in many different aspects of T cell physiology.¹⁰ Abnormalities in tyrosine phosphorylation have been shown to be involved in the pathogenesis of numerous human diseases, from autoimmunity to cancer. Thus, T cells displaying dysregulated tyrosine phosphorylation would be expected to mediate the pathologic process in autoimmunity. *PTPN22* has been found to be associated with most autoimmune disease studied so far, specifically with some of the most prevalent ones, such as GD, RA, SLE, and T1D. In addition, the functional effect of the *PTPN22* 1858 variation in the binding of LYP to Csk has been confirmed,¹³ suggesting that the association of this polymorphism with autoimmunity may be due to the role of *PTPN22* in the negative regulation of T cell activation.

This is the first study analyzing the *PTPN22* gene in BMD, and we could substantiate an association between *PTPN22* and this disease. We find an association of BMD with the functional *PTPN22* 1858T allele and the heterozygous C/T genotype. The frequency of the C/T genotype in the northern and western European population is 28.3%, and in Spanish Caucasian subjects it is 12.3%.¹⁶ Our population is from the same area in Spain, and we found a frequency of 11.8% for the C/T genotype in control individuals. This findings are in agreement with the results obtained for others authors in different autoimmune diseases,²⁰ and support the association for the *PTPN22* 1858 T allele in susceptibility to BMD and other autoimmune diseases. Indeed, the association of several autoimmune diseases with the *PTPN22* 1858C/T SNP has been considered as indicative of the existence of an inflammatory process common to many autoimmune diseases.¹⁶ According to this idea, the positive association with that gene would support the autoimmune etiology for BMD.

We selected patients with bilateral ear involvement for this study because they have several common clinical features (headache, vestibular and hearing loss progression, worst perceived health-related quality of life),²³ and a higher frequency of ANA titers was described for BMD patients.⁴ However, this *PTPN22* SNP should be evaluated in patients with unilateral MD.

CONCLUSION

The genotype C/T of the functional SNP at position 1858 of the *PTPN22* gene is associated with BMD, supporting the possible autoimmune etiology of BMD. The +49A/G *CTLA4* SNP did not show an allelic or genotypic association with BMD.

BIBLIOGRAPHY

- Derebery MJ, Rao VS, Siglock TJ, Linthicum FH, Nelson RA. Meniere's disease: an immune complex-mediated illness? *Laryngoscope* 1991;101:225-229.
- Gottschlich S, Billings PB, Keithley EM, Weisman MH, Harris JP. Assessment of serum antibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss and Meniere's disease. *Laryngoscope* 1995;105:1347-1352.
- Brooks GB. Circulating immune complexes in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:536-540.
- Ruckenstein MJ, Prasthoffer A, Bieglow DC, Von Feldt JM, Kolasinski SL. Immunologic and serologic testing in patients with Ménière's disease. *Otol Neurotol* 2002;23:517-521.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506-511.
- Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA, Gough SC. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid* 2002;12:3-6.
- Torres B, Aguilar F, Franco E, et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:2211-2215.
- Blomhoff A, Lie BA, Myhre AG, et al. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3474-3476.
- Donner H, Rau H, Walfish PG, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:143-146.
- Mustelin T, Alonso A, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol Immunol* 2004;41:687-700.
- Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (*PTPN22*) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330-337.
- Siminovitch KA. *PTPN22* and autoimmunity disease. *Nat Genet* 2004;36:1248-1249.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337-338.
- Brand O, Gough S, Heward J. HLA, CTLA-4 and *PTPN22*: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1-15.
- Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181-185.
- Orozco G, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, et al. Association of a functional single nucleotide polymorphism of *PTPN22*, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:219-224.
- Suslu N, Yilmaz T, Gursel B. Utility of immunologic parameters in the evaluation of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol* 2009;13:1-6.
- Chikuma S, Imboden J, Bluestone JA. Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T

- lymphocyte-associated antigen U. *J Exp Med* 2003;197:129–135.
19. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 2000;1:170–184.
 20. LaBerge GS, Bennett DC, Fain PR, Spritx RA. PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. *J Invest Dermatol* 2008;128:1757–1762.
 21. Orozco G, Torres B, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF, Martin J. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2004;64:667–670.
 22. Rueda B, Zhernakova A, Lopez-Nevot MA, et al. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005;66:321–325.
 23. Lopez-Escamez JA, Viciano D, Garrido-Fernandez P. Impact of bilaterality and headache on health-related quality of life in Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:409–416.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

Letter to the Editor

Genetic and clinical heterogeneity in Meniere's disease

Dear Editor,

Menière's Disease (MD) is a chronic multifactorial disorder where combined environmental and genetic factors determine its development. The article entitled Menière's disease might be an autoimmune condition? by A. Greco, A. Gallo, M. Fusconi, C. Marinelli, G.F. Macri and M. de Vincentis supports the hypothesis that Meniere's disease is an autoimmune disorder and its pathophysiology includes a viral infection.

MD is characterized by recurrent vertigo, fluctuating or progressive sensorineural hearing loss (SNHL) and tinnitus, and it is associated with an accumulation of endolymph in the inner ear (endolymphatic hydrops). Although its etiology is not known, genetics or epigenetic factors have a significant contribution. MD shows familial aggregation in European population and familial MD has a 10–20% frequency among different series of patients. Linkage studies in multiple families have shown genetic heterogeneity [1–3] and candidate gene association-studies in MD have not been able to replicate a genetic association in independent populations [4–6].

MD has also a clinical heterogeneity and clinical variants or endophenotypes probably are currently diagnosis under the umbrella of the American Academy Otolaryngology – Head and Neck Surgery guidelines for diagnosis of MD. Bilateral forms of MD cause severe chronic imbalance and hearing loss and they have been associated in Spanish population with allelic variants of genes *DRB1* [7] and *PTPN22* [8]. Migraine and other co-morbidities such as autoimmune diseases are also present in a subset of patients and this overlap can result in a diagnostic challenge. SNHL progression is variable among patients with MD and some individuals show clinical stabilization in the audiograms while others will reach a severe to profound SNHL. Moreover, incomplete clinical forms (low-tone unilateral SNHL with tinnitus not associated with vertigo, recurrent vertigo with hearing loss without tinnitus) may initially not fulfill the criteria for MD, but these patients will be diagnosed of MD several years later.

Autoimmunity will probably be involved in a subset of patients with MD as Greco et al. describe in the article, but they will represent probably less than 20%. We have estimated the prevalence of autoimmune diseases in 690 patients with MD with uni or bilateral SNHL in a multicenter study and found an increased prevalence for rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and ankylosing spondylitis [9]. Furthermore, systemic autoimmune diseases were more frequently observed in patients with MD and diagnostic criteria for migraine than cases with MD and tension-type headache. However, although there were clinical differences between patients with uni or bilateral SNHL, no differences were found in their immune profile.

Greco et al. list experimental data to support the role of autoimmunity in MD such as:

- 1) Induction of hydrops by injection of antigens or monoclonal antibodies.

- 2) The findings of several inner ear antigens inducing autoimmune MD in guinea pigs.
- 3) The elevation of circulating immune complexes in 21–96% of patients with MD.
- 4) Antiviral antibodies and lymphocytes blastogenesis found in patients with MD.

Unfortunately, the findings in the experimentally induced hydrops cannot be extended to patients since the few mutant mice that develop endolymphatic hydrops spontaneously do not have an immune dysregulation [10]. This guinea pig or chinchilla models of endolymphatic hydrops do not have vertigo. Moreover, as Greco et al. discuss that surgical obliteration of the endolymphatic sac in higher mammals (cat, monkey) does not produce endolymphatic hydrops and MD is considered a human disease. The finding of elevated immune-complexes in patients with MD has not been replicated in large cohorts and recent studies have not found elevated CIC in patients with MD [11].

Viral hypothesis is based in the finding of elevated IgG antibodies against herpes simplex virus in the perilymph of patients with MD and elevated titers of IgG against adenovirus and varicella zoster virus compared with a control group. Direct evidence of a viral neuropathy in MD was provided by the observation of viral particles in vestibular ganglion cells excised from a patient with MD, but these findings have not been demonstrated in larger series of patients. Furthermore, it is difficult to support a virus that can cause MD in human but not in superior primates.

We support that MD is a syndrome (defined by a cluster of symptoms that typically are presented simultaneously) that shows clinical heterogeneity. A subset of patients with MD probably should be diagnosed as immune-mediated inner ear disorder, but we do not have a biological marker or test to identify them.

Immuno-mediated inner ear disorders may consist of different clinical variants including sudden SNHL, rapid progressive SNHL and a subset of patients with MD. Familial aggregation remarks a significant role for genetics in MD, but the etiology for at least 50–70% of patients remains unknown.

Funding

JALE was funded by PI10/00920 Research Project from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), and ABC by a Grant BIO103-SA-51-11 from Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y Leon and EU Regional Development Funds (FEDER). The funders had no role in the comments and opinions reported in this letter.

References

- [1] Grabrikova D, Frykholm C, Friberg U, Lahsae S, Entesarian M, Dahl N, et al. Familial Meniere's disease restricted to 1.48 Mb on chromosome 12p12.3 by allelic and haplotype association. *J Hum Genet* 2010;55(12):834–7.
- [2] Arweiler-Harbeck D, Horsthemke B, Jahnke K, Hennies HC. Genetic aspects of familial Meniere's disease. *Otol Neurotol* 2011;32(4):695–700.
- [3] Hiitikko E, Kotimäki J, Kentala E, Kloockars T, Sorri M, Mannikko M. Finnish familial Meniere disease is not linked to chromosome 12p12.3, and anticipation and

- cosegregation with migraine are not common findings. *Genet Med* 2011;13(5): 415–20.
- [4] Campbell CA, Della Santina CC, Meyer NC, Smith NB, Myrie OA, Stone EM, et al. Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Ménière disease in the Caucasian population. *Am J Med Genet A* 2010;152A:67–74.
- [5] Gazquez I, Lopez-Escamez JA, Moreno A, Campbell CA, Meyer NC, Carey JP, et al. Functional variants in NOS1 and NOS2A are not associated with progressive hearing loss in Ménière's disease in a European Caucasian population. *DNA Cell Biol* 2011;30(9):699–708.
- [6] Gazquez I, Lopez-Escamez JA. Genetics of recurrent vertigo and vestibular disorders. *Curr Genomics* 2011;12(6):443–50.
- [7] Lopez-Escamez JA, Vilchez JR, Soto-Varela A, Santos-Perez S, Perez-Garrigues H, Aran I, et al. DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Meniere's disease. *Otol Neurotol* 2007;28:891–5.
- [8] Lopez-Escamez JA, Saenz-Lopez P, Acosta L, Moreno A, Gazquez I, Perez-Garrigues H, et al. Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease. *Laryngoscope* 2010;120: 103–7.
- [9] Gazquez I, Soto-Varela A, Santos S, Batuecas A, Perez-Garrigues H, Gonzalez-Oller C, et al. High prevalence of systemic autoimmune diseases in patients with Ménière's disease. *PLoS One* 2011;6(10):e26759.
- [10] Megerian CA, Semaan MT, Aftab S, Kislley LB, Zheng KS, Pawlowski QY, et al. A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss. *Hear Res* 2008;237(1–2):90–105.
- [11] Lopez-Escamez JA, Saenz-Lopez P, Gazquez I, Moreno A, Gonzalez-Oller C, Soto-Varela A, et al. Polymorphisms of CD16A and CD32 fcgamma receptors and circulating immunocomplexes in Meniere disease: a case-control study. *BMC Med Genet* 2011;12:2.

Irene Gazquez
Teresa Requena

Otology & Neurotology Group CTS495, Genyo, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer, Universidad de Granada, Junta de Andalucía, Granada, Spain

Juan Manuel Espinosa
Otology & Neurotology Group CTS495, Genyo, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer, Universidad de Granada, Junta de Andalucía, Granada, Spain
Department of Otolaryngology, Hospital San Agustín, Linares, Jaen, Spain

Angel Batuecas
Department Otolaryngology, Hospital Universitario Salamanca, Spain

Jose A. Lopez-Escamez
Otology & Neurotology Group CTS495, Genyo, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer, Universidad de Granada, Junta de Andalucía, Granada, Spain
Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain
Corresponding author at: Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain.
E-mail address: antonio.lopezescamez@genyo.es.

28 February 2012
Available online xxxx

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Polymorphisms of CD16A and CD32 Fc γ receptors and circulating immune complexes in Ménière's disease: a case-control study

José A Lopez-Escamez^{1,2*}, Pablo Saenz-Lopez³, Irene Gazquez^{1,3}, Antonia Moreno³, Carlos Gonzalez-Oller⁴, Andrés Soto-Varela⁵, Sofia Santos⁵, Ismael Aran⁶, Herminio Perez-Garrigues⁷, Águeda Ibañez⁴, Miguel A Lopez-Nevo³

Abstract

Background: Autoimmune diseases with elevated circulating autoantibodies drive tissue damage and the onset of disease. The Fc γ receptors bind IgG subtypes modulating the clearance of circulating immune complexes (CIC). The inner ear damage in Ménière's disease (MD) could be mediated by an immune response driven by CIC. We examined single-nucleotide polymorphism (SNPs) in the CD16A and CD32 genes in patients with MD which may determine a Fc γ receptor with lower binding to CIC.

Methods: The functional CD16A (Fc γ R11a*559A > C, rs396991) and CD32A (Fc γ R11a*519A > G, rs1801274) SNPs were analyzed using PCR-based TaqMan Genotyping Assay in two cohorts of 156 mediterranean and 112 Galicia patients in a case-control study. Data were analyzed by χ^2 with Fisher's exact test and Cochran-Armitage trend test (CATT). CIC were measured by ELISA for C1q-binding CIC.

Results: Elevated CIC were found in 7% of patients with MD during the intercrisis period. No differences were found in the allelic frequency for rs396991 or rs1801274 in controls subjects when they were compared with patients with MD from the same geographic area. However, the frequency of AA and AC genotypes of CD16A (rs396991) differed among mediterranean and Galicia controls (Fisher's test, corrected $p = 6.9 \times 10^{-4}$ for AA; corrected $p = 0.02$ for AC). Although genotype AC of the CD16A receptor was significantly more frequent in mediterranean controls than in patients, [Fisher's test corrected $p = 0.02$; OR = 0.63 (0.44-0.91)], a genetic additive effect for the allele C was not observed (CATT, $p = 0.23$). Moreover, no differences were found in genotype frequencies for rs396991 between patients with MD and controls from Galicia (CATT, $p = 0.14$). The allelic frequency of CD32 (rs1801274) was not different between patients and controls either in mediterranean ($p = 0.51$) or Galicia population ($p = 0.11$).

Conclusions: Elevated CIC are not found in most of patients with MD. Functional polymorphisms of CD16A and CD32 genes are not associated with onset of MD.

Background

Ménière's disease (MD) is a chronic disease defined by recurrent spells of vertigo associated with sensorineural hearing loss and tinnitus or aural fullness. Different autoimmune diseases share susceptibility loci, but consistent associations with multiple autoimmune disorders

have been restricted to three genes: the human leukocyte antigen (HLA) DRB1 gene, the PTPN22 gene encoding lymphoid tyrosine phosphatase LYP and the gene encoding cytotoxic T lymphocyte-associated 4 (CTLA-4) receptor [1]. Autoimmune mechanisms appear to be associated with the pathogenesis of some types of sensorineural hearing loss (SNHL), [2,3] including rapidly progressive bilateral SNHL (autoimmune inner ear disease), [4] sudden SNHL [5] and MD [6-8]. Allelic variants of the HLA class II gene DRB1 and the

* Correspondence: antonio.lopezescamez@epho.es

¹Otology & Neurotology Group CTS495, Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

functional polymorphism 1858C > T of the PTPN22 gene have been associated to bilateral MD in mediterranean population, suggesting an autoimmune process [9].

Diversity of populations may explain differences in HLA-DRB1 associations found in British [10], German [11], Japanese [12], Korean [13] or Spanish patients with MD [14]. Moreover, the response to steroids therapy and the finding of elevated levels of circulating immune complexes (CIC) in some patients with MD, especially in the active phase, has supported the hypothesis of autoimmunity in MD [15,16]. A decrease in CIC clearance could determine an increase of CIC levels which are deposited in the blood vessels of the endolymphatic sac, resulting in inflammation with increase in vascular permeability and the development of endolymphatic hydrops [16].

The Fc γ receptors CD16A and CD32A connect the innate and the adaptative immune response by transmitting activating signals to natural killer lymphocytes and myeloid cell upon recognition of Fc of IgG [17].

CD32A (Fc γ RIIa) exhibits low affinity for monomeric IgG, but binds IgG CIC efficiently. Two genes and two transcripts of Fc γ RIII have been described (Fc γ RIIIa, and IIIb), which also bind IgG CIC and Fc γ RIIIa (CD16A) has intermediate affinity for monomeric IgG and it is involved in the removal of CIC [18]. CD32A is expressed in all myeloid cells, platelets, and endothelial cells, whereas CD16A is present on monocytes, macrophages, NK cells and γ/δ T cells [17].

Fc γ receptors subclasses display functionally relevant genetically determined polymorphisms. So, Fc γ RIIa displays a G to A single nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide 519 in the region specifying its ligand binding domain, causing an arginine (R) to histidine (H) amino acid substitution at position 131 (rs1801274). The Fc γ RIIa-H131 allotype shows higher binding efficiency for human IgG2 and IgG3 isoforms, compared to Fc γ RIIa-R131. The Fc γ RIIIa gene displays a C to A substitution in exon 4 at nucleotide 559, resulting in a valine (V) to phenylalanine (F) substitution at amino acid position 158 (rs396991) [19]. IgG-induced NK cell activity is increased among Fc γ RIIIa-V/V158 donors, compared to Fc γ RIIIa-F/F158 individuals, due to a higher affinity of the former allotype for IgG1, IgG3 and IgG4 [18,20]. These low binding phenotypes has been associated with susceptibility to recurrent viral infections, rheumatoid arthritis [21,22] and systemic lupus erythematosus [23] and are clinically relevant because they modify the clinical course and the response to therapy of several human diseases [24].

The aim of this study was to analyze the Fc γ RIIa*519A > G and Fc γ RIIIa*559A > C SNPs in the Fc receptor cluster in patients with definite MD.

Methods

Subjects

DNA Samples from 268 unrelated patients with MD and 770 controls from two ethnically defined regions were included in a prospective multicenter study between January 2004 and December 2009. All patients were diagnosed according to the diagnostic scale for MD of the American Academy of Otolaryngology- Head and Neck Surgery (AAO-HNS) [25]. Group 1 consisted of 156 Caucasian patients from the east and southeast areas of Spain (85 unilateral, 71 bilateral MD) that were compared with 626 controls from the same area. Group 2 was recruited to replicate the results of group 1 and included 112 (47 unilateral, 65 bilateral MD) Caucasian patients and 144 controls from Galicia (northwest of Spain). Five centers recruited samples from patients with MD for this study: Hospital La Fe from Valencia, Hospital Virgen de las Nieves from Granada, Hospital de Poniente from El Ejido, Almeria (group 1) and Hospital Santiago de Compostela and Hospital de Pontevedra (group 2). Controls for group 1 were unrelated Caucasian volunteer blood donors at Almeria and Granada; controls for group 2 were provided by the Spanish DNA BioBank <http://www.bancoadn.org>. The selection of controls was matched by age and gender in both populations. Caucasian subjects with a different origin (Maghreb, Romani minority) were excluded to avoid a substructure bias in the controls (Table 1).

The subject's informed consent was obtained to participate in the study according to the Declaration of Helsinki and the local Institutional Board approved the study. The clinical features and HLA-DRB1 and DQB1 genotyping of some patients with MD from both groups were previously reported [14].

DNA extraction and genotyping

All genomic procedures were carried out at Department of Immunology, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. Total genomic DNA was automatically isolated from peripheral blood of patients and healthy controls

Table 1 Baseline characteristics of case and control subjects

Variable	Southeast population		Northwest population	
	MD	Control	MD	Control
Subjects	156	626	112	144
Female gender (%)	53.8	59.7	50.0	51.4
Age (years)				
Mean	56.1	38.0	55.5	37.2
Median	56	37	58	38.5
Range	15-88	19-68	12-79	18-64
SD	13.1	9.5	13.8	13.1

using the M-48 robot (Genovision) and the MagAttract DNA Blood Mini M48 (192) kit from Qiagen. The genotyping of the FcγRIIa*519A > G (rs1801274) and FcγRIIIa*559A > C (rs396991) SNPs were performed using a predeveloped TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR reaction was carried out using the Assays-on-Demand SNP genotyping kit (AB). SNPs amplification assays were used according to the manufacturer's instructions. In short, 5 μl of reaction solution containing 10ng of DNA was mixed with 2.5 μl of 2× TaqMan Universal PCR Mix (AB), 0.05 μl of predeveloped assay reagent from the SNP genotyping product (AB) containing two primers and two MGB-Taqman probes and 1.45 μl of desionized water. Reaction conditions consisted of pre-incubation at 50°C for 2 minutes and at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. Amplifications and analysis were performed in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (AB) using the SDS 1.4 software for allelic discrimination (AB).

Determination of circulating immunocomplexes

Serum samples from 331 patients (85 mediterranean and 203 Galicia patients) were obtained to determine CIC concentrations. So, an Autostat^{II} test for C1q CIC kit (HYCOR, Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands) was used to detect immune complexes containing both C1q and IgG in a Hytec 288 Plus System (HYCOR). Positive and negative controls and reference values were provided by the manufacturer (0-40 μg/ml).

Statistical analysis

Allelic and genotype frequencies were calculated by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each SNP among controls. For 2 × 2 contingency tables of allele frequencies of patients with MD and controls, odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI), χ^2 test and Fisher's exact test were calculated to determine the exact two-sided p-values using SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Genotype frequencies were compared for each of the 2 × 3 contingency tables by Cochran-Armitage trend test, which may have more power than Fisher's exact test if a trend exists across genotype categories under the additive genetic effect model. Probability values (*p*) were corrected by multiplying the *p* value by the number of genotypes compared. p-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The CD32 (FcγRIIa*519A > G) and CD16A (FcγRIIIa*559A > C) SNPs in the Fcγ receptors were selected to investigate their association with MD.

Genotype distributions of both SNPs in mediterranean and Galicia controls exhibited Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown), and the minor allele frequencies of all SNPs were over 5% in controls from both groups.

First, the frequencies of genotypes AA and AC for FcγRIIIa*559A > C were significantly different in controls from southeast and northwest of Spain (Table 2). So, the genotype AA of FcγRIIIa (low binding phenotype) is more common in Galicia than in mediterranean population (Fisher's exact test, $p = 6.9 \times 10^{-4}$). Second, we compared the genotypes distribution of both SNPs between patients with uni and bilateral MD (Table 3). There was no difference in the genotype of both FcγRIIa*519A > G and FcγRIIIa*559A > C SNPs between patients with one or both ears affected either in mediterranean or Galicia population (all, $p > 0.05$).

The CD32 allelic frequencies (rs1801274) did not differ between patients and controls either in southeast ($p = 0.51$) or northwest groups ($p = 0.11$). Moreover, AA and AG genotypes did not increase the risk for MD in any of both populations (Table 4).

In addition, no differences were found in the allelic frequency of CD16A (rs396991) in controls subjects when they were compared with patients with MD from the same geographic area. Although the genotype AC of CD16A receptor was significantly more frequent in mediterranean controls than in MD patients (OR = 0.63 (0.44-0.91), Fisher's test, corrected $p = 0.02$), a genetic additive effect for the allele C was not observed (Cochran-Armitage trend test, $p = 0.23$). The genotype AA of FcγRIIIa (rs396991) encoding the FcγRIIIa-F/F158 phenotype was not associated with MD (95% CI, 1.04-2.10; corrected $p = 0.06$) (Table 5). Moreover, we replicated our observations in the northwest group, and no differences were found in genotype frequencies for rs396991 between patients with MD and controls from Galicia (CATT, $p = 0.11$).

Circulating immunocomplexes were investigated in 331 patients with MD. There was an increase of CIC in 25 patients (7.6%). No difference was found in the frequency of elevated CIC between patients with unilateral (7%) or bilateral involvement (8.4%). In addition, we did not found association between elevated CIC and the homozygous genotype AA of FcγRIIIa either in mediterranean ($p = 0.42$) or Galicia ($p = 0.64$) patients in our series.

Discussion

Our study shows that heterogeneity within caucasian population should be considered in genetic association studies. The distribution of frequencies of CD16A genotypes AA and AC was different in Galicia and mediterranean controls. The genotype frequencies in our Mediterranean

Table 2 Distribution of rs396991 (CD16A) and rs1801274 (CD32) genotypes and phenotypes in controls subjects from southeast and northwest populations

Genotype	Phenotype	Southeast	Northwest	Fisher exact p values	Corrected p
CD16A		N = 626 (%)	N = 141 (%)		
AA	176F/F	221 (35.3)	73 (51.8)	2.3×10^{-4}	6.9×10^{-4}
AC	176F/V	314 (50.2)	54 (38.3)	7×10^{-3}	0.02
CC	176V/V	91 (14.5)	14 (9.9)	0.09	NS
CD32		N = 349 (%)	N = 144 (%)		
AA	131R/R	95 (27.2)	28 (19.4)	0.04	NS
AG	131R/H	162 (46.4)	83 (57.6)	0.01	0.03
GG	131H/H	92 (26.4)	33 (22.9)	0.25	NS

Low affinity binding phenotypes are 176F/F and 131 R/R.

controls are identical to frequencies reported in a previous study from the same geographical area [21]. The difference of CD16A with the Galicia population may indicate a differential immunogenetic background between populations.

These two SNPs were chosen because they determine a low binding phenotype for Fcγ receptors and their consistent association with rheumatoid arthritis [21,22] and systemic lupus erythematosus [23].

The genotype AC of the FcγRIIIa*559A > C (CD16A) gene is overrepresented in mediterranean controls and it may confer some protection for MD in mediterranean patients, although the trend test did not confirm an additive effect in homozygous subjects. In addition, the

genotype AA of CD16A was marginally associated with MD in mediterranean population. However, these finding could not be replicated in the population from Galicia within the same country. The allele A encodes for a V to F substitution at amino acid position 158, resulting in an FcγRIIIa allotype with a lower affinity. The lower affinity of this Fc receptor for IgG subclasses may decrease the binding efficiency for IgG1, IgG3 and IgG4 complexes, resulting in a lower clearance of CIC.

We cannot support the hypothesis that FcγR polymorphisms determine a CIC-mediated damage in the inner ear of patients with MD, although the efficiency of FcγR-IgG interaction may predict the efficacy of CIC clearance [17]. A less efficient CIC clearance may lower the threshold for complexes deposition in the vascular endothelium, with the induction of inflammation

Table 3 Distribution of CD16a and CD32 genotypes in patients with uni and bilateral MD (χ2 test)

Southeast group	Unilateral	Bilateral	P value	
CD16A genotype		N = 85 (%)	N = 71 (%)	
AA	37 (43.5)	33 (46.5)	0.91	
AC	33 (38.8)	27 (38.0)		
CC	15 (17.6)	11 (15.5)		
CD32 genotype		N = 85(%)	N = 71(%)	
AA	21 (24.7)	22 (31.0)	0.59	
AG	42 (49.4)	29 (40.8)		
GG	22 (25.9)	20 (28.2)		
Northwest group	Unilateral	Bilateral	P value	
CD16A genotype		N = 45 (%)	N = 65 (%)	
AA	17 (37.8)	29 (44.6)	0.34	
AC	22 (48.9)	28 (43.1)		
CC	6 (13.3)	8 (12.7)		
CD32 genotype		N = 47 (%)	N = 65 (%)	
AA	12 (25.5)	18 (27.7)	0.84	
AG	25 (53.2)	36 (55.4)		
GG	10 (21.3)	11 (16.9)		

Table 4 Frequency of CD32 alleles and genotypes among MD patients and healthy controls (Fisher's exact test)

Southeast	MD N = 155 (%)	Controls N = 349 (%)	OR (95% CI)	P value
AA	43 (27.7)	95 (27.2)	1,03 (0.67-1.57)	0.49
AG	70 (45.2)	162 (46.4)	0,95 (0.65-1.39)	0.43
GG	42 (27.1)	92 (26.4)	1,04 (0.68-1.59)	0.47
Allele	2n = 310 (%)	2n = 698 (%)	1,00 (0.77-1.31)	0.51
A	156 (50.3)	352 (50.4)		
G	154 (49.7)	346 (49.6)		
Northwest	MD N = 112 (%)	Controls N = 144 (%)	OR (95% CI)	P value
AA	30 (26.8)	28 (19.4)	1,52 (0.84-2.72)	0,11
AG	61 (54.5)	83 (57.6)	0,88 (0.53-1.45)	0.35
GG	21 (18.8)	33 (22.9)	0,77 (0.42-1.43)	0.26
Allele	2n = 224 (%)	2n = 228 (%)	1.25 (0.88-1.79)	0.11
A	121 (54.0)	139 (48.3)		
G	103 (46.0)	149 (51.7)		

Table 5 Frequency of CD16A alleles and genotypes among MD patients and healthy controls

Southeast	MD N = 156 (%)	Controls N = 626 (%)	OR (95% CI)	Fisher's exact p values	Corrected p
AA	70 (44.9)	221 (35.3)	1.49 (1.05-2.12)	0.018	0.054
AC	60 (38.5)	314 (50.2)	0.62 (0.43-0.89)	0.006	0.018
CC	26 (16.7)	91 (14.5)	1.17 (0.73-1.89)	0.29	NS
Allele	2n = 312 (%)	2n = 1252 (%)	1.17 (0.91-1.52)	0.13	NS
A	200 (64.1)	756 (60.4)			
C	112 (35.9)	496 (39.6)			

Northwest	MD N = 110 (%)	Controls N = 141 (%)	OR (95% CI)	Fisher's exact p values	Corrected p
AA	46 (41.8)	73 (51.8)	0.67 (0.40-1.11)	0.07	NS
AC	50 (45.5)	54 (38.3)	1.34 (0.80-2.23)	0.15	NS
CC	14 (12.7)	14 (9.9)	1.32 (0.60-2.91)	0.31	NS
Allele	2n = 220 (%)	2n = 282 (%)	0.75 (0.51-1.09)	0.08	NS
A	142 (64.5)	200 (70.9)			
C	78 (35.5)	82 (29.1)			

No additive effect was observed in homozygous subjects with Cochran-Armitage trend test in the southeast ($p = 0.23$) and the northwest group ($p = 0.14$).

observed in autoimmune diseases as rheumatoid arthritis [20].

The rs 396991 of CD16A has been associated with rheumatoid arthritis [21,22], systemic lupus erythematosus [23,24], vasculitis [26], demyelinating disease [27], immune thrombocytopenic purpura [28] and myasthenia gravis [29]. This is the first report describing an association between MD and polymorphisms of CD16A receptor in mediterranean population, although we could not replicate this effect in the Galicia population. We also previously found that the HLA class II allele DRB1*1101 was associated in mediterranean patients with MD, but not association was found in patients from Galicia [14].

MD is multifactorial and the interaction of several genes with the environment is probably involved. Several mutations have been described in the coagulation factor C homology (COCH) gene (14q12-13), which cause the autosomal dominant SNHL DFNA9 (OMIM603196) [30], and a high prevalence of symptoms of MD has been described in European families with a P51S mutation in exon 4 of COCH gene [31]. However, these mutations were not found in patients with MD [32].

Many tests have been developed for the detection of CIC, including polyethylene glycol (PEG) precipitation and radial immunodiffusion and cellular based assays. No single procedure appears to detect all types of CIC, however, those procedures which detect CIC containing fragments of complement (e.g. C1q and C3d) appear to detect clinically relevant events. Although several reports have found elevated CIC in 54-96% of patients with MD using the PEG precipitation assay [15,16], another study using our method, a solid phase immunosorbent assay

(ELISA) for C1q and IgG also found an elevation of CICs in 4% of 49 patients with MD [34]. Our results confirm this study and found elevated CIC in 7.4% of 331 patients. Moreover, subanalysis of patients with bilateral MD did not show a higher frequency of elevated CIC. Our data cannot support that pathophysiology of MD is different in patients with uni or bilateral involvement.

Histopathology studies in temporal bones from patients with MD have shown endolymphatic hydrops and vestibular fibrosis in the inner ear. Immunohistochemistry have found deposits of C3 and C1q in the membranous labyrinth located at the basal membrane, subepithelial connective tissue, vestibular ganglion and endolymphatic sac of patients with MD [35,36]. It appears that immune injury may be induced in the inner ear at sites where CIC are deposited in the vessels. It is hypothesized that deposits of CIC in the vessels of the stria vascularis may interfere with the recycling of K^+ ions, resulting in an osmotic imbalance, cellular stress and probably dysfunction of fibrocytes of the spiral ligament. The flux of K^+ ions into the endolymphatic compartment from the stria vascularis reflects the current flow underlying the endolymphatic potential [37]. In a guinea pig model, it appears that type I fibrocytes and other cells are damaged before the onset of hydrops, but the mechanism is unknown [38].

One of the limitations of this study is that we could not demonstrate an association between patients with the genotype AA of CD16A and elevated CIC. This could be explained because blood samples were not obtained in an acute phase of the disease, and CIC levels may fluctuate within the same patient according to the

disease activity. Our next study will look at the CIC level during the acute phases of MD to compare them with basal CIC levels in subjects with genotype AA of CD16A.

Conclusions

Elevated CIC were found in 7% of patients with MD. Polymorphisms of CD16A (FcγRIIIa*559A > C, rs396991) and CD32A (FcγRIIa*519A > G, rs1801274) genes are not associated with onset of MD.

Acknowledgements

This study was supported by a research project FIS PI07/0035. JALE was partially supported by ISCIII research grant INT09/229. The 3130 XL Genetics Analyzer was funded by grant IF06/37291 from Ministry of Science.

Author details

¹Otology & Neurotology Group CTS495, Department of Otolaryngology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain. ²GENYO, - Centro de Genómica e Investigación Oncológica - Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía, Granada, Spain. ³Department of Immunology, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ⁴Otology & Neurotology Group CTS495, Department of Biotechnology, Hospital de Poniente, El Ejido, Almería. ⁵Division of Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Complejo Hospitalario Universitario, Santiago de Compostela, Spain. ⁶Department of Otolaryngology, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Spain. ⁷Division Otoneurology, Department of Otorhinolaryngology, Hospital La Fe, Valencia, Spain.

Authors' contributions

JALE and MLN conceived and coordinated the study and draft the manuscript. JALE, ASV, SS, IA and HPG participated in the clinical design of the study, recruited patients with Meniere's disease and collected blood samples for DNA extraction. PSL, IG and AM recruited controls and carried out the genotyping studies. CGO and AI carried out the immunoassays for immunocomplexes. JALE and IG performed the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 June 2010 Accepted: 5 January 2011

Published: 5 January 2011

References

- Brand O, Gough S, Heward J: HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med* 2005, **7**:1-15.
- McCabe BF: Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979, **88**:585-9.
- Tebo AE, Szankasi P, Hillman TA, Litwin CM, Hill HR: Antibody reactivity to heat shock protein 70 and inner ear-specific proteins in patients with idiopathic sensorineural hearing loss. *Clin Exp Immunol* 2006, **146**:427-32.
- Harris JP, Weisman MH, Derebery JM, et al: Treatment of corticosteroids-responsive autoimmune inner ear disease with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003, **290**:1875-83.
- Amor-Dorado JC, Paco L, Martin J, Lopez-Nevot MA, Gonzalez-Gay MA: Human leukocyte antigen- DQB1 and -DRB1 associations in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss from a defined population of northwest Spain. *Acta Otolaryngol* 2005, **125**:1277-1282.
- Hughes GB, Kinney SE, Barna BP, et al: Autoimmune reactivity in Meniere's disease: a preliminary report. *Laryngoscope* 1983, **93**:410-417.
- Yoo TJ, Shea J Jr, Ge X, et al: Presence of autoantibodies in the sera of Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001, **110**:425-9.
- Fattori B, Nacci A, Dardano A, et al: Possible association between thyroid autoimmunity and Ménière's disease. *Clin Exp Immunol* 2008, **152**:28-32.
- Lopez-Escamez JA, Saenz-Lopez P, Acosta L, et al: Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease. *Laryngoscope* 2010, **120**:103-7.
- Xenellis J, Morrison AW, McClowskey D, Festenstein H: HLA antigens in the pathogenesis of Ménière's disease. *J Laryngol Otol* 1986, **100**:21-24.
- Anweiler DJ, Jahnke K, Grosse-Wilde H: [Ménière's disease as an autosome dominant hereditary disease]. *Laryngorhinootologie* 1995, **74**:512-515.
- Koyama S, Mitsuishi Y, Bibee K, Watanabe I: HLA associations with Meniere disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1993, **113**:575-578.
- Yeo SW, Park S, Jeon E, Lee HY, Pyo CW, Ki TG: Influence of human leukocyte antigen in the pathogenesis of Meniere's disease in the south Korean population. *Acta Otolaryngol* 2002, **122**:851-56.
- Lopez-Escamez JA, Vilchez JR, Soto-Varela A, et al: HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Meniere's disease in southern European population. *Otol Neurotol* 2007, **28**:891-5.
- Brookes GB: Circulating immune complexes in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986, **112**:536-540.
- Derebery MJ, Rao VS, Siglock TJ, Linthicum FH, Nelson RA: Meniere's disease: an immune complex-mediated illness? *Laryngoscope* 1991, **101**:225-229.
- Van Sorge NM, Van der Pol W-L, Van de Winkel JGJ: Fcγ polymorphisms: implication for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 2003, **61**:189-202.
- Van der Pol WL, vande Winkel JGJ: IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics* 1998, **48**:222-32.
- Wu J, Edberg JC, Redecha PB: A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 1997, **100**:1059-70.
- Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, et al: On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest* 1992, **90**:1537-46.
- Nieto A, Caliz R, Pascual M, Matarán L, Garcia S, Martin J: Involvement of Fcγ receptor IIIa genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, **43**:735-9.
- Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, et al: Fcγ receptor type IIIa is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum* 2000, **43**:2328-34.
- Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, et al: Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum* 2000, **43**:793-800.
- Edberg JC, Langefeld CD, Wu J, et al: Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIa (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002, **46**:2132-40.
- Committee on Hearing and Equilibrium: Guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995, **113**:181-185.
- Aksu K, Kitapcioglu G, Keser G, et al: FcγRIIIa, IIIa and IIIb gene polymorphisms in Behcet's disease: do they have any clinical implications? *Clin Exp Rheumatol* 2008, **4**(Suppl 50):S77-83.
- Van der Pol WL, van der Berg LH, Scheepers RH, et al: IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 2000, **54**:1661-5.
- Cines DB, McMillan R: Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol* 2007, **14**:511-4.
- Raknes G, Skeie GO, Gilhus NE, Aadland S, Veleder C: FcγRIIIa and FcγRIIIB polymorphisms in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1998, **81**:173-6.
- Robertson NG, Lu L, Heller S, et al: Mutations in a novel Cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 1998, **20**:299-303.
- Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI, et al: High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999, **8**:1425-1429.
- Sanchez E, Lopez-Escamez JA, Lopez-Nevot MA, Lopez-Nevot A, Cortes R, Martin J: Absence of COCH mutations in patients with Meniere disease. *Eur J Hum Gen* 2004, **12**:75-8.
- Savastano M, Giacomelli L, Marioni G: Non-specific immunological determinations in Meniere's disease: any role in clinical practice? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007, **264**:15-19.

Lopez-Escamez *et al. BMC Medical Genetics* 2011, **12**:2
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/2>

Page 7 of 7

34. Perez Garrigues H, Carmona E, Morera C, Sanchez-Cuenca JM: **Circulating auto-antibodies in Meniere's disease.** *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1995, **112**:225-228.
35. Hausler R, Arnorld W, Schifferlic J: **C3 and C1q complement deposits in the membranous labyrinth of patients with Meniere's disease.** *Adv Otorhinolaryngol* 1988, **42**:116-122.
36. Yazawa Y, Kitahara M: **Immunofluorescent study of the endolymphatic sac in Meniere's disease.** *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1989, **468(Suppl)**:71-76.
37. Salt AN: **Regulation of endolymphatic fluid volume.** *Ann NY Acad Sci* 2001, **942**:306-312.
38. Shinomori Y, Kimura RS, Adams JC: **Changes in immunostaining for Na+, K+, 2Cl-cotransporter 1, taurine and c-Jun N-terminal kinase in experimentally induced endolymphatic hydrops.** *ARO Abstract* 2001, **24**:134.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/2/prepub>

doi:10.1186/1471-2350-12-2

Cite this article as: Lopez-Escamez *et al.*: Polymorphisms of CD16A and CD32 Fc γ receptors and circulating immune complexes in Ménière's disease: a case-control study. *BMC Medical Genetics* 2011 **12**:2.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



**BASES INMUNOGENÉTICAS DE LA
ENFERMEDAD DE MENIERE:
Búsqueda de marcadores genéticos**



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE **GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA**

