



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

“ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO RS 1107946 DEL GEN COL1A1 EN
UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS CON OTOSCLEROSIS”

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO

P R E S E N T A :
DRA. GABRIELA CORDERO OLMOS

PROFESOR TITULAR
DR. MARIO S. HERNÁNDEZ PALESTINA

ASESORES
DR. RAFAEL FRANCO CENDEJAS
DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES
DR. MARIO S. HERNÁNDEZ PALESTINA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO DE 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

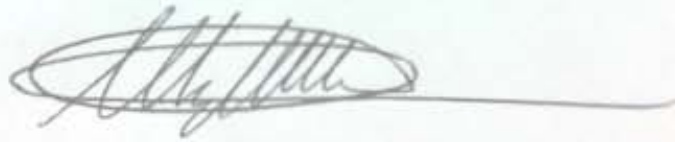


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

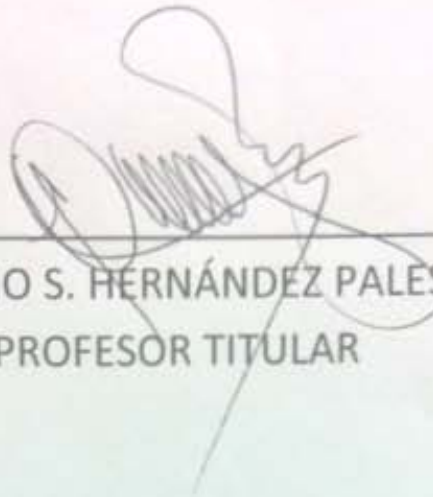
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DR. ALBERTO UGALDE REYES-RETANA
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA



DR. MARIO S. HERNÁNDEZ PALESTINA
PROFESOR TITULAR



DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES
ASESOR CLÍNICO

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQUETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ
SUBDIRECTORA DE POSTGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA

DR. ALBERTO UGALDE REYES-RETANA
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DR. MARIO S. HERNÁNDEZ PALESTINA
PROFESOR TITULAR

DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES
ASESOR CLÍNICO

DR. RAFAEL FRANCO CANDEJAS
ASESOR METODOLÓGICO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme en este camino.

A mi familia, por su apoyo y amor incondicional, especialmente a mi papá que despertó la inquietud acerca del origen de la otosclerosis al padecerla.

Al Dr. Hernández Palestina por su empeño en la enseñanza académica y personal, por ser mi inspiración diaria como otorrinolaringólogo y por estimularme constantemente.

Al Dr. Franco Cendejas por ser un gran ejemplo de médico y persona, por creer en mi trabajo y por su apoyo constante en la realización de este trabajo.

A la Dra. Valdés por su apoyo, su interés en la docencia e investigación, su profesionalismo y su confianza en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Casas, la Dra. Arenas, la Dra. Hernández y la Q.F.B. Claudia Colín por su colaboración, tiempo y disponibilidad constante a lo largo de este trabajo.

A mis maestros, por sus enseñanzas, su paciencia y su vocación que día a día forman parte de mí como médico y persona.

Al grupo de residentes, por su hermandad, por sus enseñanzas y por hacer el viaje más ligero.

A mis pacientes, por ser el libro del que más aprendí y seguiré aprendiendo.

Contenido

	Página
Resumen.....	7
I.Antecedentes.....	8
II.Justificación.....	21
III.Planteamiento del problema.....	22
IV.Hipótesis.....	22
IV.Objetivos.....	22
V.Material y Métodos.....	23
VI.Resultados.....	31
VII. Discusión.....	34
VIII.Conclusión.....	37
IX.Bibliografía.....	38
X.Anexos.....	42

RESUMEN

La otosclerosis es una enfermedad de remodelación anormal en la cápsula ótica que causa hipoacusia conductiva y sensorineural progresiva; tiene una prevalencia de 0.2-1% en la población de raza blanca; su etiología permanece incierta, sin embargo el virus del sarampión, algunas hormonas, proteínas morfogenéticas del hueso, alelos de HLA (antígeno leucocitario humano) y ciertos factores genéticos han sido implicados en el desarrollo de dicha enfermedad. Debido a que en la otosclerosis los genes juegan un papel importante en la etiología, varios estudios han asociado el metabolismo anormal óseo de la otosclerosis con algunos genes como COL1A1, TGFB1, BMP2 y BMP4. En estos estudios se ha demostrado asociación estadísticamente significativa del gen de la colágena tipo I y la otosclerosis, sin embargo, también existen estudios que reportan lo contrario. Se ha observado que consistentemente los polimorfismos del gen COL1A1 presentan asociación con la otosclerosis en diferentes poblaciones, ninguna en población mexicana. En un esfuerzo para identificar la asociación de estos genes con la otosclerosis en población mexicana se plantea un estudio de casos y controles en el cual se examina un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en 52 pacientes no relacionados entre sí con otosclerosis y en 51 sujetos no relacionados entre sí como grupo control, en un hospital de tercer nivel de atención a lo largo de un año. El objetivo de este estudio pretende esclarecer si la presencia de este gen está realmente asociada con la otosclerosis en nuestra población. Por otro lado, no existe en la literatura nacional estudios similares realizados en población mexicana. Se analizaron las muestras sanguíneas de 103 sujetos (52 casos y 51 controles), para la identificación del polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1 mediante PCR-RT. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (casos y controles) respecto a la presencia del polimorfismo, por tanto concluimos que no existe asociación entre dicho polimorfismo y la otosclerosis por lo menos en un grupo de sujetos mexicanos.

ANTECEDENTES

La otosclerosis es una enfermedad de remodelación anormal del laberinto óseo y estribo que se sabe solo afecta a la cápsula ótica de humanos y produce de manera progresiva hipoacusia conductiva o mixta y raramente hipoacusia sensorineural pura.¹

En 1735 el anatomista italiano Antonio Valsalva fue el primero en reportar la lesión,² sin embargo, fue descrita por primera vez como una enfermedad específica que fija el estribo en 1893 por Adam Politzer, mismo que le dio el nombre de otosclerosis.³

La otosclerosis es una enfermedad que se manifiesta particularmente en la población caucásica y es rara en la raza negra (<1%).¹

Muchos estudios han establecido que el periodo clínico de inicio se da principalmente entre los 15 y 45 años de edad, y con mayor prevalencia en mujeres que en hombres a razón de 2:1, sin embargo en estudios histopatológicos de huesos temporales no se muestra esta diferencia de género.⁴ La enfermedad es bilateral en aproximadamente en el 75% y unilateral en el 25% restante.⁵

Schuknecht y Barber⁵ clasificaron la otosclerosis como clínica e histopatológica.

- La clínica se define como una lesión que fija la platina del estribo.
- La histopatológica se refiere a casos con hallazgos histopatológicos sin fijación de estribo.
- La forma coclear se refiere a casos de otosclerosis histopatológica suficientemente extensa para afectar el endostio de la cóclea sin fijación de estribo.⁶

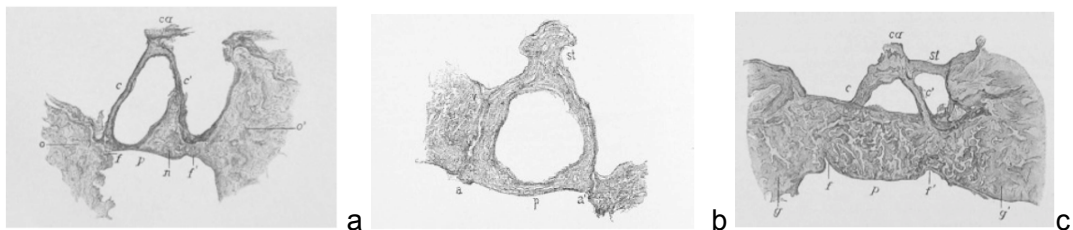


Figura 1. Estribo con neoformación ósea de la cápsula a nivel de la crura anterior (a), crura posterior (b) y en toda la extensión de la ventana oval (c). Tomado de Mudry A. Adam Politzer (1835-1920) and the description of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2006;27:276-281.

La incidencia de otosclerosis clínica entre los miembros de la familia de los pacientes otoscleróticos es de aproximadamente 20-25%, y solo el 0.2-1% en la población general.^{7,8}

Hueb y colaboradores⁵ encontraron que la incidencia de otosclerosis histopatológica es de 12.7% tras la revisión de 1, 452 huesos temporales, una vez excluidos los de niños y de raza blanca. Es decir, la otosclerosis histopatológica es aproximadamente 10 veces más común que la otosclerosis clínica.

El sitio más común de afección dentro del hueso temporal es la porción anterior de la ventana oval (81%), seguida de la ventana redonda y de la pared medial y apical de la cóclea. Otros sitios de involucro son la pared posterior de la ventana oval, la pared posterior y anterior del conducto auditivo interno, alrededor del acueducto coclear, alrededor de los conductos semicirculares y dentro de la platina.⁹ La incidencia de la afección extensa de la ventana oval (platina obliterante) en la otosclerosis varía de 7-11% mientras que la incidencia de la obliteración de la ventana redonda es de tan solo uno por ciento.¹⁰

Actualmente, la otosclerosis es un término utilizado para describir una enfermedad del hueso a nivel de la cápsula ótica, caracterizada por fases alternantes de resorción y formación ósea, en las cuales el hueso maduro es removido por los osteoclastos y reemplazado por los osteoblastos con hueso nuevo de mayor grosor, celularidad y vasculatura.

El término "otosclerosis" lo introdujo Politzer en 1894 refiriéndose a la etapa final inactiva en la cual el hueso ya está engrosado o esclerótico. El término "otoespongiosis" fue descrito en 1912 por Siebenmann, y se refiere a la fase activa y vascular del proceso, inicialmente fue un término utilizado ampliamente en Europa, sin embargo el término de "otosclerosis" se utilizó preferentemente en Reino Unido y Estados Unidos, y fue adoptado en la literatura para definir dichos cambios patológicos¹¹, aunque actualmente sabemos, gracias a las aportaciones de Parahy y Linthicum,¹² que las lesiones otoscleróticas y otoespongióticas podían ocurrir al mismo tiempo y no necesariamente preceder una de la otra o corresponder a una fase inicial o final respectivamente.

Wang y colaboradores obtuvieron biopsias de otros sitios esqueléticos y demostraron que la otosclerosis no ocurre en ningún sitio fuera del hueso temporal.¹³

El hueso afectado presenta un proceso de remodelación en el cual el hueso normal es reemplazado por hueso otosclerótico. Los focos otoscleróticos presentan varios componentes como formación ósea por los osteoblastos, destrucción ósea por osteoclastos, proliferación vascular, de fibroblastos y de histiocitos. Schuknecht y Barber utilizaron los siguientes criterios para indicar la actividad histopatológica en un foco otosclerótico: 1) áreas de tejido no óseo con un número incrementado de células,

2) evidencia de resorción ósea por osteoclastos y/o neoformación ósea por osteoblastos, 3) incremento en la proliferación vascular y engrosamiento de la mucosa suprayacente y 4) afinidad del tejido óseo por tinciones acidofílicas.¹³

Por otro lado Lim y colaboradores¹⁴ identificaron tres tipos de lesiones en la otosclerosis: la celular (espongiótica), la fibrosa y la esclerótica. Las lesiones activas de otospongiosis son frecuentemente rodeadas por lesiones escleróticas menos activas, esta porción periférica de la lesión es lo que Manasse nombró "lesión pre-otosclerótica" o lagunas (*blue mantles*) de Manasse.¹⁵

Causee y colaboradores¹⁶ encontraron histiocitos que contenían lisosomas en la etapa avanzada de la otosclerosis, estas células presentaban un proceso de lisis por enzimas hidrolíticas; además, se encontraron enzimas osteolíticas en la perilinfa de pacientes operados de estapedectomía.¹⁷ Todo esto sugiere que las enzimas tienen un papel más importante en la progresión de la enfermedad que únicamente la actividad de los osteoclastos.

Se sabe que la fijación del estribo inicia con la calcificación del ligamento anular, uniendo la lesión otosclerótica de la ventana oval con la platina y, subsecuentemente, la supra estructura. Guild¹ reportó que la hipoacusia conductiva inicia con la fijación ósea y que las brechas aéreo-óseas amplias se deben a mayor afección esclerótica. Por otro lado, Parachí y Linthicum mostraron que existe una relación entre el grado de afección del endostio coclear y la helenización del ligamento espiral con la hipoacusia neurosensorial, ya que dentro de la cóclea, cerca del ligamento espiral, la remodelación ósea y la liberación de enzimas interactúan con los elementos nerviosos.¹² La hipoacusia neurosensorial únicamente se ha encontrado en huesos temporales con otosclerosis extensa y multifocal,¹⁸ y un incremento de hipoacusia asociado en la conducción ósea es únicamente reportado en oídos con dos o más sitios de afección del endostio.¹⁹ Por lo contrario, Schuknecht y Barber no encontraron correlación entre la magnitud de la hipoacusia neurosensorial y la afección del endostio, ni con el tamaño, la actividad y la localización de la lesión esclerótica, estos autores sostienen que cualquier lesión otosclerótica suficientemente grande para causar hipoacusia neurosensorial invariablemente también fija la platina.⁶ Hinojosa y Marion observaron que el patrón de degeneración de los elementos sensorineurales periféricos en los casos de otosclerosis con hipoacusia sensorineural son similares a los observados en los casos de presbiacusia.

SÍNTOMAS

Los síntomas ocurren dependiendo del sitio del foco otosclerótico y se caracterizan por

hipoacusia, acúfeno, vértigo o una combinación de éstos. La hipoacusia generalmente es de tipo conductivo, sin embargo, estudios a largo plazo sugieren que alrededor del 10% de los pacientes desarrollan hipoacusia sensorineural pura.

El acúfeno es un síntoma común en pacientes con otosclerosis, y tanto el acúfeno como el vértigo ocurren más frecuentemente en pacientes con lesiones tipo escleróticas, ya que las lesiones otoscleróticas pueden dañar algunas regiones del nervio coclear, utricular o facial y causar degeneración neural de los mismos. Saim y Nadol²⁰. postularon que los síntomas vestibulares en los pacientes con otosclerosis son más comunes en los casos con umbrales óseos más elevados, es decir, con mayor grado de hipoacusia neurosensorial, ya que el daño al nervio coclear se correlaciona con la degeneración del nervio vestibular, lo que aparentemente es independiente a la afección otosclerótica del laberinto posterior, aunque éste también puede estar involucrado.

ENFERMEDADES ASOCIADAS

Algunos autores sugieren que la otosclerosis y la Enfermedad de Menière pueden coexistir y tener un origen común. Liston y Paparella²¹ apoyan que la otosclerosis puede causar hidrops endolinfático por involucro del ligamento espiral que pudiera resultar en una irrupción química de los electrolitos u obstrucción del conducto y saco endolinfático.

La fijación del martillo asociada a otosclerosis se reporta entre el 1-10%, esta fijación puede deberse a la osificación de los ligamentos suspensorios anterior y superior del martillo, provocando adhesión de la cabeza del martillo a la pared anterior del epítímpano. El origen de esta fijación puede ser principalmente congénito o secundario a infección crónica, aunque también se ha descrito que los huesos escleróticos tienen alta incidencia de helenización de los ligamentos maleolares.²²

DIAGNÓSTICO

La otosclerosis clínica se diagnostica mediante los siguientes criterios:

1. Historia de hipoacusia lentamente progresiva generalmente bilateral y de inicio en la juventud.
2. En la exploración física, una otoscopía normal o si el paciente se encuentra en fase activa (fase de otopospongiosis) se puede observar el signo de Schwartze (coloración rojiza del promontorio y ventana oval que se transluce a través de la membrana).

3. Diapasones con patrón generalmente conductivo.
 4. Valoración audiológica con una audiometría tonal con patrón de hipoacusia conductiva o mixta con un nicho de Carhart, generalmente con una brecha aéreo-ósea y reflejos estapediales ausentes o con patrón de “on-off”.
- En otosclerosis coclear: Audiometría con componente sensorineural de pérdida en todas las frecuencias o en las frecuencias altas con curvas de tipo planas, ascendentes o en “muesca”.
5. Historia familiar de la enfermedad.
 6. Antecedente de mayor progresión con el embarazo en caso de tratarse de paciente del género femenino.
 7. Generalmente sin antecedentes de cuadros infecciosos óticos.²³

El diagnóstico clínico basado en la historia, examen físico y audiometría puede ser apoyado por estudios de imagen. La tomografía computada de alta resolución (HRCT, siglas en inglés) es la modalidad de elección, debido a la capacidad de detectar lesiones óseas patológicas dentro y alrededor de la platina, cóclea y laberinto. La otosclerosis en la imagen tomográfica se identifica como un foco hipodenso dentro de la cápsula ótica, más comúnmente anterior a la ventana oval. Otros hallazgos por tomografía incluyen la platina engrosada, estrechamiento del nicho de la ventana oval o redonda y signo del doble halo (lesión hipodensa alrededor de la cóclea).

Varios autores han evaluado la sensibilidad de la tomografía para diagnosticar otosclerosis en las últimas décadas. Estudios recientes han reportado una sensibilidad por encima del 90% utilizando tomografía de alta resolución, sin embargo, al comparar los hallazgos tomográficos con los histopatológicos, existe una tasa significativa de falsos negativos en la tomografía. Desde que se introdujo la tomografía computada a la otología, ésta ha mostrado ser un instrumento útil para el diagnóstico de múltiples enfermedades, sin embargo, no es una herramienta que se utilice de rutina en la otosclerosis ya que el diagnóstico generalmente es clínico.^{24, 25}

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial de primera intención se realiza con la fijación de la cadena osicular de cualquier otro origen, sin embargo, se debe considerar importante diferenciarlo de la enfermedad de Paget (osteítis *deformans*), ya que la otosclerosis difiere de ésta en que solo afecta el laberinto óseo y no algún otro hueso del cuerpo humano, además de presentarse en población más joven.

TRATAMIENTO

Médico

Shamboug mostró una terapia conservadora con fluoruro de sodio. El efecto se explica mediante la estabilización de las placas otoscleróticas debido a que el fluoruro de sodio incrementa la resistencia contra osteoclastos.²⁵ No existen estudios respecto de esta terapia, por lo que su uso ya no se recomienda. Recientemente se ha sugerido el uso de bifosfonatos de tercera generación (zoledronato o risedronato) para estabilizar la progresión de la hipoacusia neurosensorial en pacientes con otosclerosis con adecuada respuesta.²⁶

Quirúrgico

Está indicada la estapedectomía o estapedotomía, la selección se realiza con base en un estudio audiométrico, con componentes neurosensoriales bajos y con brecha aéreo-ósea mayor o igual a 20 dB. Se interviene preferentemente el oído en peor estado y 6 meses a 1 año después se realiza la otra intervención, si cumple con los criterios quirúrgicos en el oído contralateral. En el caso de otosclerosis coclear, se considera el implante coclear en caso de cumplir con los criterios del mismo.

Auxiliar auditivo

Se valorar audiológicamente su aplicación en pacientes fuera de criterios quirúrgicos o que no deseen el procedimiento.

ETIOLOGÍA

Se han postulado múltiples teorías acerca de la etiología y, a pesar de la búsqueda exhaustiva, el origen verdadero de la enfermedad permanece poco claro. Las teorías que actualmente son consideradas relevantes se interesan en más de una causa pero no se comprende de qué manera se relacionan, por lo que se han planteado una variedad de factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.

Teoría vascular. Arnold y Plester²⁷ sugirieron que los cambios patológicos de los vasos causaban reacciones patológicas de la mucosa y submucosa del oído medio y posteriormente resorción ósea.

Teoría enzimática. Causse y colaboradores observaron un trastorno en el equilibrio de las enzimas tripsina-antitripsina dentro de los focos otoscleróticos con una propagación de enzimas líticas en la cápsula ótica.

Teoría endocrina. Está ya descrito que los estrógenos estimulan la actividad

osteocítica y pueden desempeñar un papel importante en la osificación del foco oteo esclerótico, se ha reportado también que las manifestaciones se han visto relacionadas con el embarazo en un 30%.¹¹ Por otro lado, la función anormal de las glándulas paratiroides puede conducir a una alteración en la resorción ósea debido a los niveles afectados de calcio y fósforo.

Teoría autoinmune. La cual postula que existen anticuerpos contra la colágena tipo II y remanentes cartilagosos embrionarios de la cápsula ótica que fomenta el desorden osteoblástico y osteoclástico.

Teoría de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP's) y el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β). Esta teoría ha propuesto a estas moléculas como responsables del metabolismo patológico de la remodelación ósea con resultados no contundentes.¹¹

Teoría de la etiología viral. Ésta está ligada al virus del sarampión (paramixovirus). En 1986, McKenna y colaboradores, postularon la teoría viral como causa de la oteo esclerosis, cuando observaron por microscopía electrónica estructuras filamentosas similares a la nucleocápside del virus del sarampión en osteoblastos encontrados en lesiones oteo escleróticas, sin embargo, en un estudio reciente en población mexicana, donde se estudiaron 93 pacientes, no se encontró ácido ribonucleico (ARN) del virus en las platinas de pacientes postoperados de estapedectomía.²⁸

Teoría genética. La oteo esclerosis tiene un fuerte componente genético, la mayoría de los estudios en familias con oteo esclerosis apoya el patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta.²⁹ La enfermedad es genéticamente heterogénea con evidencia de defectos hasta la fecha en 9 *loci* y en expresión del gen de la colágena tipo I, COL1A1. Los *loci* identificados asociados con oteo esclerosis son: OTOSC1 en el cromosoma 15q25-q26, OTOSC2 en el cromosoma 7q34-36, OTOSC3 en el cromosoma 6p21.3-22.3, OTOSC4 en el cromosoma 16q21-q23.2, OTOSC5 en el cromosoma 3q22-24, OTOSC7 en el cromosoma 6q13-16.1, esta región contiene 66 genes conocidos de los cuales COL1A1 fue considerado un buen candidato, sin embargo, no se encontraron mutaciones en este gen, OTOSC8 mapeado en el cromosoma 9p13.1-9q21.11, esta región contiene 24 genes conocidos y 121 genes previstos, el análisis de secuencia incluye los genes TJP2 y TRMP3, los cuales codifican para una proteína de unión celular y para un canal de calcio de los osteoclastos respectivamente, y, finalmente, OTOSC9.^{30, 31}

Teoría de desórdenes del tejido conectivo. Éstos son similares a los encontrados en osteogénesis imperfecta que involucran la colágena tipo I, que corresponde al objetivo

central del presente estudio. Varios autores han reportado la posible relación entre la otosclerosis y la osteogenesis imperfecta (OI); aunque la OI es una enfermedad generalizada, existen lesiones en el hueso temporal parecidas a las de la otosclerosis. Las similitudes entre la OI y la otosclerosis fueron reportadas por Ogilvie y Hall.¹¹ Ambas enfermedades poseen un patrón de herencia autosómico dominante, son más frecuentes en mujeres, ambas están caracterizadas por un patrón de actividad osteoblástica y osteoclástica. Por lo anterior, se ha postulado que ambas enfermedades pueden ser resultado de una anomalía genética idéntica, siendo la otosclerosis no solo una forma menos severa de presentación de OI, sino también localizada.

Los defectos en los genes de la colágena, COL1A1 y COL1A2, están claramente asociados con la OI, ya que distintas mutaciones provocan diferentes grados de aberración estructural de la colágena tipo I y poseen diferentes grados de severidad y manifestaciones clínicas. La similitud entre la OI y la otosclerosis convierte a COL1A1 y COL1A2 en genes candidatos para la etiología de la otosclerosis. McKenna³² y colaboradores analizaron estos dos genes y encontraron asociación significativa de tres polimorfismos dentro del COL1A1 con otosclerosis clínica tanto esporádica como familiar. No encontraron asociación con el gen COL1A2 ni con el gen COL2A1 de la colágena tipo II, lo cual sugiere que el gen COL1A1 puede desempeñar un papel importante en la etiología de la otosclerosis, del mismo modo en pacientes con OI tipo 1 leve, ocurren varias mutaciones diferentes estrictamente dentro del gen COL1A1 sin defectos en el COL1A2. Estas mutaciones del gen COL1A1 son resultado de una expresión nula debido al ARN inestable. Estos hallazgos sugieren que una presentación leve de OI y algunos casos de otosclerosis pueden estar fuertemente relacionados y presentar ambos, mutaciones en el gen COL1A1.³³

Tanto en el 2004, McKenna y colaboradores³⁴, como en el 2007, Chen y colaboradores³⁵ enfocaron su atención en los polimorfismos de nucleótido simple, en las regiones reguladoras del gen COL1A1, con la hipótesis de que las variaciones asociadas pueden incrementar la transcripción genética, por tanto, incrementar la formación de colágena alfa 1 y contribuir al depósito anormal de hueso en la cápsula ótica.

Dado que las asociaciones deben ser confirmadas mediante replicación en poblaciones independientes, la validez de la asociación genética de COL1A1 con otosclerosis continúa incierta.^{36, 37}

COL1A1

La colágena tipo I madura está formada por un heterotrímero de 2 cadenas $\alpha 1$, (producidas por el gen COL1A1), y una cadena $\alpha 2$, (producidas por el gen COL2A1), ambas cadenas son similares en estructura, forman una triple hélice de 300 nm de longitud con telopéptidos terminales N y C no estructurados en los extremos. La característica distintiva de esta triple hélice es un residuo obligatorio de glicina en cada tercer posición de la cadena formando un triplete repetido en su mayoría, de glicina, prolina, hidroxiprolina.

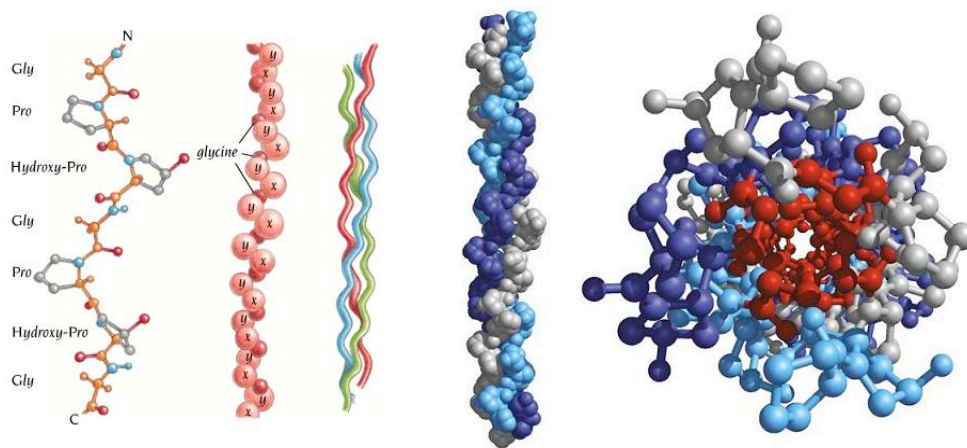


Figura 2. A) Esquema de tripe hélice de glicina hidroxiprolina y prolina de la colágena tipo I. B) Corte longitudinal y sagital de la representación de la cadena de colágena tipo I.

El precursor de colágena, procolágena, se sintetiza y adquiere su estructura terciaria sin la necesidad de pasar por el retículo endoplásmico. Es secretada por las células con propéptidos terminales aun unidos a los extremos N y C. Posteriormente estos propéptidos de los extremos son escindidos por proteinasas especializadas N y C, lo que dispara el auto-ensamblaje de la molécula de colágena ya madura en fibrillas. Estas fibrillas se ensamblan con diferentes componentes de la matriz extracelular y forman el andamiaje estructural de huesos, piel y otros tipos de tejido conjuntivo.³⁸

COL1A1 se localiza en 17q21.33, tiene un tamaño de 18kb, el ARN codifica para 52 exones. Del exón 6 al exón 49 codifican para un dominio alfa hélice. La mayoría de estos exones consta de 45 pb, 54 pb o múltiplos de 45 ó 54 pb.

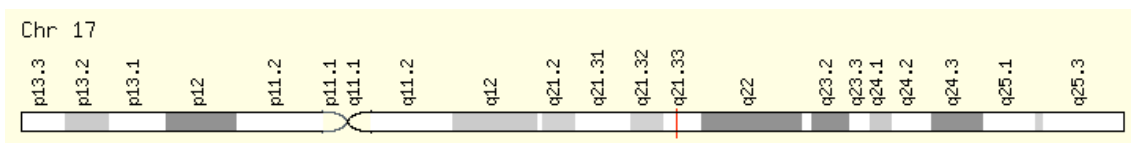


Figura 3. Esquema del cromosoma 17 humano. Se indica con línea roja la localización en el brazo largo del gen de la colágena tipo I (17q21.33).

Las mutaciones de esta proteína están implicadas en varias enfermedades, entre éstas se encuentran el Síndrome de Ehlers Danlos³⁹, Osteogénesis Imperfecta^{40, 41}, Dermatofibrosacoma Protuberans^{42, 43} y la Enfermedad de Caffey .^{44, 45.}

POLIMORFISMOS

El polimorfismo en Genética se refiere a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen; es decir, es una variación en la secuencia de una región determinada del ácido desoxirribonucleico (ADN) entre los individuos de una población.

Existen diferentes tipos de polimorfismos:

- Polimorfismo de nucleótido simple (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*).
- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*).
- Polimorfismos en el número de repetición en tandem (VNTR, *Variable Number Tandem Repetition*).

Las fuentes del polimorfismo pueden ser resultado de repeticiones secuenciales, deleciones o recombinaciones. El polimorfismo genético puede ser resultado de procesos aleatorios o ser inducidos por agentes externos como virus o radiación.

Las aplicaciones del estudio de los polimorfismos son diversas; en especial sirven para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva y en el estudio de las enfermedades multigénicas.

POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)

Los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos (llamados "alelos") son más frecuentes que las mutaciones, esto es, se presentan en una frecuencia mayor al 1%. La gran mayoría de los SNPs tiene dos alelos, los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, lo cual se basa en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto, para el alelo más frecuente, heterocigoto u homocigoto para el alelo menos frecuente.⁴⁶

Los SNPs pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNPs se les conoce como "no sinónimos", puesto que

este tipo de SNPs afecta directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones.⁴⁷ Existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad, susceptibilidad o protección a ésta, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influyendo en la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de *splicing* (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas.^{48, 49.}

Otro tipo de SNPs son los llamados “sinónimos” (o silenciosos) los cuales no alteran la conformación del gen; sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido.⁵⁰

Según su localización en el genoma, los SNPs se clasifican en:

- iSNP, si están localizados en regiones intrónicas,
- cSNP, en regiones codificantes (exones), pueden estar representados por SNPs sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP),
- rSNP, en regiones reguladoras,
- gSNP, localizados en regiones intergenómicas.⁵¹

En 1998, la NCBI, (National Center for Biotechnology Information) creó la primera base de datos dbSNP (*SNP data base*), que ha servido como base central de registro de todos los SNP reportados hasta este momento.⁵²

Para representar los múltiples reportes de variantes en la misma localización del genoma, la base de datos dbSNP mantiene dos tipos de registros: el *submit SNP* (ss), para el reporte original y el *reference SNP* (rs), que es el número que se da a todos SNP reportados posterior al original.⁵³

En los estudios de asociación se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la patogénesis de la enfermedad y, así, determinar si existe algún tipo de relación con ella, para lo cual se deben primeramente identificar genes candidatos que se crea o se sepa son importantes en la patogénesis de una condición. Este tipo de genes pueden ser candidatos debido a un extenso estudio de la enfermedad y/o pueden servir para comparar los niveles de expresión génica en tejidos normales y enfermos; el siguiente paso es identificar los diferentes polimorfismos sobre el gen que pudieran estar afectando su función y, finalmente, examinar si los polimorfismos elegidos ocurren más frecuentemente en individuos que tienen la enfermedad

respecto de una población control o si este tipo de variación predice el desarrollo de la enfermedad en un estudio de cohorte. Sin embargo, una asociación positiva puede no ser siempre debida a un papel causal del polimorfismo, por ejemplo, puede haber asociaciones de falsos positivos si un grupo étnico diferente (con distinta frecuencia del polimorfismo) está sobrerrepresentado en el grupo de casos o control.⁵⁴

Existen varias formas de estudiar polimorfismos, pero una de ellas es la de PCR en tiempo real (RT-PCR), método basado en la aplicación de la técnica de PCR (Reacción en Cadena Polimerasa) y en la creación de dos sondas alelo-específicas, las cuales emiten una señal fluorescente al unirse al templado. Este tipo de análisis es más utilizado actualmente porque ya existen sondas prediseñadas para un sinnúmero de polimorfismos, ya descritos.

Los polimorfismos reportados en la literatura del gen COL1A1 son:

Tabla 1. Polimorfismos reportados en diferentes poblaciones

SNP	Nombre alternativo	Posición COL1A1	Valor de P (asociación con otosclerosis)
rs16970089	Up1	5' Upstream	0.604
rs11327935	PCol1	5' Upstream	0.659
rs9898186	Int1	Intrón 1	0.699
rs1800012	Sp1	Intrón 1	0.963
rs2586498	Int5/rs7406586	Intrón 5	0.453
rs2075555		Intrón 11	0.771
rs17639446		Intrón 12	0.428
rs2141279		Intrón 15	0.022
rs2696247		Intrón 28	0.642
rs2857396	Int30	Intrón 30	0.826
rs2075559		Intrón 36	0.771
rs2586488	Int44	Intrón 44	0.919
rs1061237	Ex51/30-UTR	3' UTR	0.757
rs909102		3' Downstream	0.958
rs1800012	Sp1	Intrón 1	0.262

Tomado de: Schrauwen I, Khalfallah A, Ealy M, Fransen E, Claes C, Huber A, Murillo LR, Masmoudi S, Smith RJH, Van Camp G. 2012. COL1A1 association and otosclerosis: A meta-analysis. *Am J Med Genet Part A* 158A:1066–1070.⁵⁵

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)

Es un método basado en la PCR tradicional desarrollada por Kary Mullis en los años 80. Esta técnica original permite amplificar secuencias específicas de ADN más de un billón de veces.

La PCR-RT generalmente requiere de sondas fluorogénicas que “iluminan o fluorescen” mostrando la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación.

Esta metodología permite cuantificar una secuencia específica de ADN presente en la muestra biológica en estudio. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral (*Threshold level*) se correlaciona con la cantidad inicial de ADN blanco, permitiendo de esta manera poder cuantificarlo. El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral se conoce como *Threshold cycle* (CT) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor CT, menor será la cantidad de ADN blanco o templado inicial.

Las ventajas de la PCR-RT son:

- Sistema homogéneo que evita la manipulación de amplificado, evitando el grave problema de contaminaciones con el mismo,
- Rapidez en la obtención de resultados,
- Amplio rango dinámico de cuantificación,
- Permite monitorear la eficiencia de la reacción,
- Mínima variabilidad en los resultados, dando una cuantificación confiable y precisa.

La habilidad que posee la PCR-RT para monitorear el progreso de la amplificación del ADN blanco en tiempo real se logra mediante diferentes químicas e instrumentación específicas. Generalmente, las químicas consisten en diferentes compuestos fluorescentes o fluoróforos que pueden proporcionar los cebadores y sondas fluorescentes. Dentro de los colorantes fluorescentes, el más utilizado es el SYBR Green I®, que tiene la propiedad de unirse al ADN de doble cadena de manera inespecífica, emitiendo hasta 1000 veces más fluorescencia cuando se encuentra unido al ADN que cuando está libre en solución (absorbe luz de 480 nm de longitud de onda y emite a 520 nm), por tanto, el incremento de la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN doble hebra presente en el tubo de reacción y la misma se mide al final de la fase de extensión de la reacción.

Su principal desventaja es la inespecificidad, ya que se une independientemente de la secuencia del ADN, y puede generar resultados falsos positivos al detectar ADN espurios como los dímeros de cebadores de la reacción. Una forma de asegurar en estos casos la especificidad de la detección es analizando las curvas de disociación o de *melting*. Se puede lograr una mejor caracterización del producto de amplificación, sometiendo el mismo a un aumento de temperaturas para determinar la temperatura de disociación o *melting point*, característica para cada producto, ya que depende de la longitud y composición nucleotídica del mismo. La presencia de dos o más picos, sugiere que se ha obtenido más de un amplificado y que el proceso de amplificación no fue específico para el ADN blanco.

También se pueden implementar los sistemas de señalización basados en cebadores fluorescentes. Estos varían considerablemente desde el más simple llamado LUXTM primers (*Light Upon Extension*) a los más complejos como Scorpion™ primers. Ambos tipos de cebadores poseen en solución una secuencia corta auto-complementaria que hace que los mismos estén “apagados” (*quenched*) y no emitan fluorescencia.

Cuando se produce la hibridación del cebador al ADN blanco y su estructura se despliega, se observa un incremento importante en la fluorescencia, el cual es medido justamente durante esta etapa.

La tercera categoría de sistemas de señalización para la PCR-RT es aquella que envuelve un tercer oligonucleótido fluorescente localizado entre los cebadores, denominado comúnmente sonda. A diferencia de los sistemas anteriores, éste agrega especificidad a la reacción, al intervenir un tercero y, a veces, hasta un cuarto oligonucleótido o sonda. Dicho efecto se basa en que la excitación electrónica de uno de los colorantes fluorescentes es transferida al colorante aceptor cuando ambos se encuentran en posiciones cercanas, impidiendo la emisión de fluorescencia del primero. Cuando ambas moléculas se alejan, por diferentes mecanismos, según el caso, los colorantes fluorescentes emiten fluorescencia libremente.

JUSTIFICACIÓN

La otosclerosis es una enfermedad progresiva e incapacitante, por la hipoacusia que origina en varios grados. En la literatura anglosajona se considera que tiene una prevalencia de aproximadamente 0.2%, por lo que se considera una enfermedad rara; en México no se conoce la prevalencia de esta enfermedad, sin embargo, existen múltiples casos reportados en nuestro medio, sobre todo en hospitales de concentración, como en el que se lleva a cabo este estudio.

Debido a que no se conoce la etiología de la otosclerosis y existen algunos estudios que sustentan la etiología genética como principal factor causal, este estudio pretende contribuir al conocimiento del origen de esta enfermedad, al detectar la presencia del polimorfismo rs1107946 del gen COL1A1 en pacientes con otosclerosis, con la finalidad de realizar una correlación entre estas entidades en población mexicana, ya que, hasta la fecha, no existe ningún estudio similar en la literatura nacional. Por otro lado, existe controversia mundial acerca de la asociación del gen COL1A1 con la otosclerosis, a cuyo esclarecimiento pretende contribuir este trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gen COL1A1 fue el primero en ser asociado con la otosclerosis por McKenna en 1998³². Chen y colaboradores se enfocaron en los SNPs de las regiones regulatorias del COL1A1 encontrando asociación significativa con la otosclerosis, sin embargo, los estudios genéticos más recientes han generado resultados controversiales en diferentes poblaciones (McKenna y col. 2004, Rodríguez y col. 2004, Chen 2007, Khalfallah et al. 2011). Este estudio pretende contribuir en la resolución de este conflicto.

HIPÓTESIS

¿Existe asociación entre el polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1 en un grupo de pacientes mexicanos con otosclerosis?

OBJETIVO GENERAL

Determinar asociación entre el polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1 y la otosclerosis.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar la presencia del polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1 en población con otosclerosis
- Determinar la presencia del polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1 en población sin otosclerosis
- Evaluar el comportamiento de la enfermedad en función del antecedente hormonal y de sarampión
- Describir las características de familiares afectados

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

- Casos y controles
- Analítico
- Observacional
- Retrospectivo

7.2 Descripción del universo de trabajo

Pacientes mexicanos con otoseclerosis clínica confirmada mediante hallazgos quirúrgicos (estapedectomía) durante el periodo de junio 2012- mayo 2013.

7.3 Criterios de inclusión

- Casos:
 - Sin otras causas de hipoacusia
 - Género indistinto
 - Edad 18-60 años
 - Con y sin antecedentes familiares de otosclerosis
 - Pacientes que acepten participar voluntariamente en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado
- Controles:
 - Pacientes de edad, género y origen geográfico pareados con casos
 - Sin diagnóstico de otosclerosis
 - Audiometría normal o sin hallazgos audiométricos de hipoacusia conductiva
 - Sin antecedentes familiares de otosclerosis
 - Sin sospecha o diagnóstico previo de hipoacusia, vértigo o acúfeno

7.4 Criterios de exclusión

- Fijación de estribo por otras causas detectado durante procedimiento quirúrgico o historia clínica y examen físico

7.5 Criterios de eliminación

- Muestra sanguínea no viable
- Que el paciente decida voluntariamente salirse del estudio.

La detección de pacientes con otosclerosis candidatos a cirugía de estribo, se realizó por:

1. Historia de hipoacusia lentamente progresiva
2. En la exploración física, una otoscopía normal o si el paciente se encuentra en fase activa (fase de otospongiosis) se puede observar el signo de Schwartze (coloración rojiza del promontorio y ventana oval que se transluce a través de la membrana)
3. Valoración audiológica con una audiometría tonal con una hipoacusia conductiva o mixta con un nicho de Carhart y una brecha aéreo-ósea > 20 dB y reflejos estapediales ausentes

7.6 Tamaño de muestra

Cálculo de tamaño de la muestra por conveniencia limitado a pacientes que ingresan al Instituto Nacional de Rehabilitación y se realiza diagnóstico clínico de otosclerosis. Relación de casos:controles de 1:1.

7.7 **Tabla 2.** Descripción de las variables de estudio y sus escalas de medición.

DEFINICIONES				
VARIABLE	CONCEPTUAL	OPERACIONAL	CATEGORÍA	ESCALA
Edad	Años de vida cronológica	Edad del paciente en años	Cuantitativa Continua de intervalo	Años
Género	Sexo del paciente	Masculino o femenino	Cualitativa dicotómica nominal	M/F*
Bilateralidad de la Otosclerosis	Afección de uno o ambos oídos	Oído izquierdo, derecho o ambos	Cualitativa nominal	I/D/B**
Edad de inicio de la enfermedad	Años de vida el inicio de la enfermedad	Edad del paciente en años	Cuantitativa Continua de intervalo	Años
Antecedente de familiar sospechoso	Antecedente de familiar con sospecha clínica de Otosclerosis o	Sí o no	Cualitativa dicotómica nominal	S/N***

	sordera en edad temprana (joven o adulto joven)			
Antecedente de familiar confirmado	Antecedente familiar de Otoesclerosis diagnosticada (joven o adulto joven)	Sí o no	Cualitativa dicotómica nominal	S/N***
Familiar afectado 1er grado	Antecedente de familiar con otoesclerosis, o sordera en edad temprana (joven o adulto joven)	Número de familiares de 1º grado afectados	Cuantitativa discreta	Número de familiares
Familiar afectado 2º grado	Antecedente de familiar con otoesclerosis, o sordera en edad temprana (joven o adulto joven)	Número de familiares de 2º grado afectados	Cuantitativa discreta	Número de familiares
Familiar afectado 3º grado	Antecedente de familiar con otoesclerosis, o sordera en edad temprana (joven o adulto joven)	Número de familiares de 3º grado afectados	Cuantitativa discreta	Número de familiares
Familiar afectado 4º grado	Antecedente de familiar con otoesclerosis, o sordera en edad temprana (joven o adulto joven)	Número de familiares de 4º grado afectados	Cuantitativa discreta	Número de familiares
Antecedente de consanguinidad	Antecedente familiar de consanguineidad	Sí o no	Cualitativa dicotómica nominal	S/N
Antecedente de endogamia	Antecedente familiar de endogamia	Sí o no	Cualitativa dicotómica nominal	S/N

Antecedente Hormonal	(Solo en caso de pacientes femeninos) Antecedente de aparición de la enfermedad o aumento en la severidad con el embarazo	Sí o no	Cualitativa dicotómica nominal	S/N***
PCR –RT rs 1107946	Presencia de polimorfismo detectado mediante PCR-RT	Sí o no	Cualitativa dicotómica nominal	S/N***

*M: masculino, F: femenino **I: izquierdo, D: derecho, B: bilateral ***S:sí, N:no

7.8 Metodología

Se estudió el polimorfismo rs 1107946 ubicado en el cromosoma 17q21.33 en la región 5' que presenta un cambio de Guanina por Timina (G/T).

CCCTACTGTGGGTCAGTTCCAAGAGA[G/T]CCCCTCCCTAATAGGCGACAGGGGT

Se analizaron 111 pacientes no relacionados entre sí de los cuales se incluyeron 52 casos con otosclerosis y 51 controles, todos pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación. Los controles fueron seleccionados aleatoriamente de aquellos pacientes ingresados al Instituto por otra causa que no fuera sospecha de hipoacusia; dato que se verificó con la realización de audiometría tonal con resultado normal o presbiacusia en aquellos mayores de 50 años de edad.

El ADN de todos los pacientes se obtuvo a partir de 5 ml de sangre en tubo Vacutainer ® (BD, E.U.A.) lila con EDTA, como anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético) con previo consentimiento informado. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento, para la correcta preservación del ADN.

Se extrajo y cuantificó el ADN de todas las muestras, posteriormente se amortiguó con agua estéril para homogenizar todas las muestras a 12 nmol/μl y poder ser procesadas para la PCR-RT. Todas las muestras fueron analizadas para el polimorfismo de Guanina a Timina del gen de la colágena tipo 1 alfa 1 (rs 1107946). Finalmente se realizó en análisis de Hardy–Weinberg el cual confirmó que todas las muestras se encontraban en equilibrio genético.

Se realizó un análisis descriptivo de los datos utilizando medidas de tendencia central y de dispersión (media \pm desviación estándar; mediana y valores mínimo-máximo) para las variables de tipo cuantitativo (continuas). Para el análisis estadístico de estas variables se utilizó la prueba U de Mann Whitney. En el caso de las variables cualitativas, se utilizaron frecuencias absolutas y relativas (porcentajes), y para la relación de variables cualitativas se utilizó χ^2 y prueba exacta de Fisher, según fuera el caso.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa STAT. Versión 12 y Epi Info.

7.9 Técnica de extracción de ácidos nucleicos

El tubo con la muestra de sangre se almacenó a temperatura de 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Se centrifugaron a 4,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos, se tomó 1 ml de plasma y éste se colocó en un vial de 1.5 ml y se adicionó 10 mg de proteinasa K y posteriormente se incubaron a 55°C por 20 minutos.

Posteriormente se agregaron 3 ml de *buffer* de lisis marca bioMérieux® (Francia), se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para la extracción se utilizó el sistema automatizado NucliSENS easyMAG de bioMérieux® (Francia).

Se transfirió la muestra lisada a los contenedores del equipo NucliSens easyMAG y se adicionaron 100 μ l de sílica magnética MagSIL (50 microlítrros de sílica + 50 microlítrros (μ l) de H₂O libre de DNasas y RNasas) a cada muestra y se homogenizaron.

El principio de extracción de este equipo se basa en la tecnología de extracción con sílice (también denominada tecnología BOOM®).

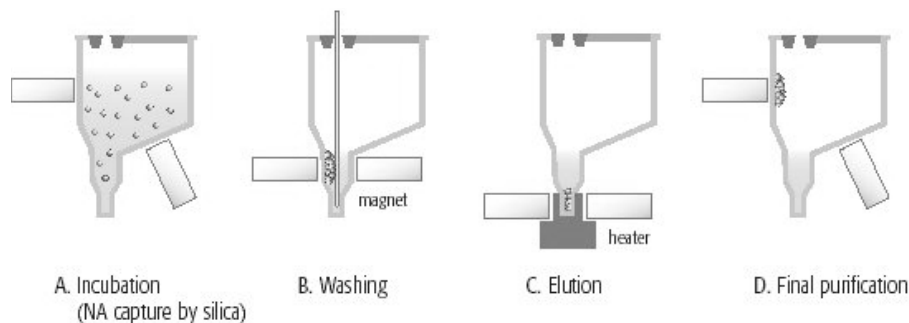


Figura 4. Técnica de extracción de ADN.

Posteriormente se continuó con la extracción automatizada de acuerdo a las instrucciones del equipo. Se diluyeron los ácidos nucleicos con 60 µl de *buffer* de elución y se transfirieron a tubos de 0.5 ml y se guardaron a -70°C.

Para cuantificar el DNA extraído se empleó el equipo NanoDrop (Thermo).

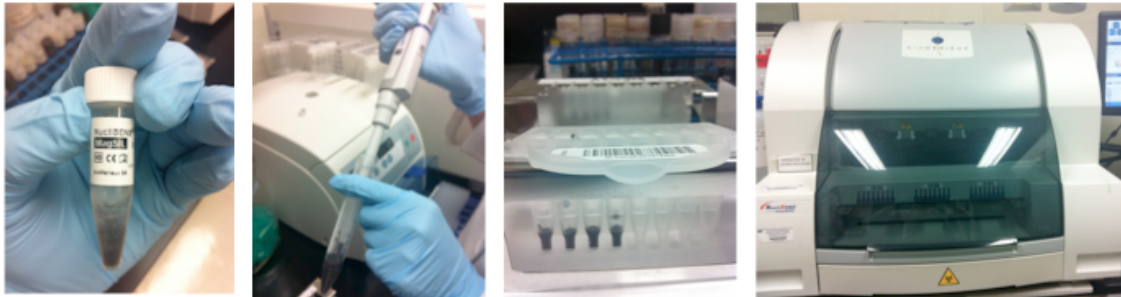


Figura 5. Pasos para extracción de ADN

7.10.-Técnica de PCR- Tiempo Real con sonda TaqMan para rs1107946

Este ensayo utiliza la actividad 5' nucleasa de la polimerasa junto con dos sondas TaqMan para discriminar entre los dos alelos de un SNP. Las dos sondas TaqMan son complementarias a los dos alelos de un SNP y cada una tiene una molécula supresora de fluorescencia o *quencher* en su extremo 3' y una molécula fluorescente en su extremo 5'. Siempre que el *quencher* y la molécula fluorescente se encuentran formando parte de la misma molécula (sonda), no se emitirá fluorescencia. Durante la fase de alineamiento-extensión, la sonda y los iniciadores se unen al ADN diana y la ADN polimerasa comienza a "replicar" el ADN a partir del iniciador, introduciendo nucleótidos nuevos. Al toparse con la sonda hibridada, la polimerasa empieza a degradarla y a introducir nucleótidos nuevos en su lugar, hasta llega al extremo 3'. Esto origina que el *quencher* y la molécula fluorescente se separen, lo que resulta en la emisión de fluorescencia. La fluorescencia emitida es de diferente color dependiendo del genotipo de la muestra y los resultados se registraron utilizando el equipo RealTime ABI PRISM® 7900 Sequence Detector.

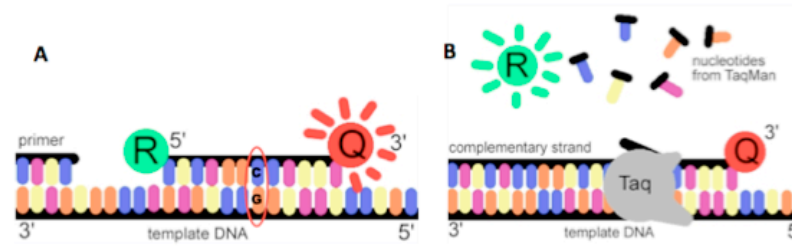
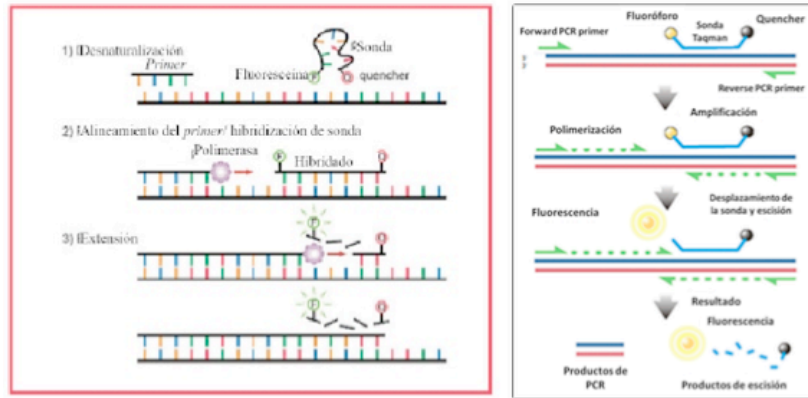


Figura 6. Pasos de la PCR-RT con uso de sonda Taqman. **A.** La sonda Taqman se une a la diana de ADN, y también el primer. Debido a que el primer está unido, la Taq polimerasa puede crear ahora una hebra complementaria. **B.** El indicador de fluorescencia (R), es liberado al estenderse la Taq polimerasa a través de la molécula. Ahora lejos del quencher (Q), el indicador R emite fluorescencia en un estado de excitación.

En las sondas Taqman de Applied Biosystems® (E.U.A.), que fueron las que se utilizaron en este estudio, la correlación sonda/secuencia es la siguiente:

FLUORESCENCIA DETECTADA	INDICATIVA DE:
VIC	Homocigoto para el alelo X
FAM	Homocigoto para el alelo Y
Ambas	Heterocigoto

De esta manera se interpretó la fluorescencia de VIC como homocigoto para el alelo T (Timina) y la de FAM para el alelo G (Guanina) o ambas para los heterocigotos (GT).

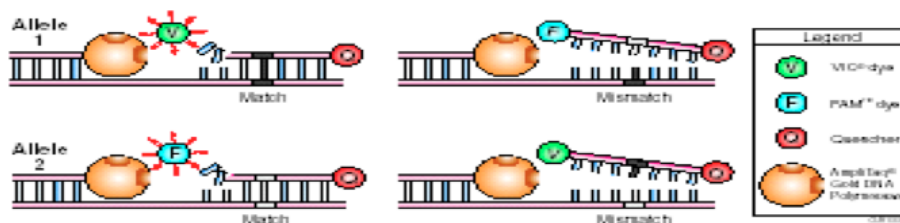


Figura 7. Esquema de fluorescencia en el ADN durante la PCR-RT con sonda TaqMan

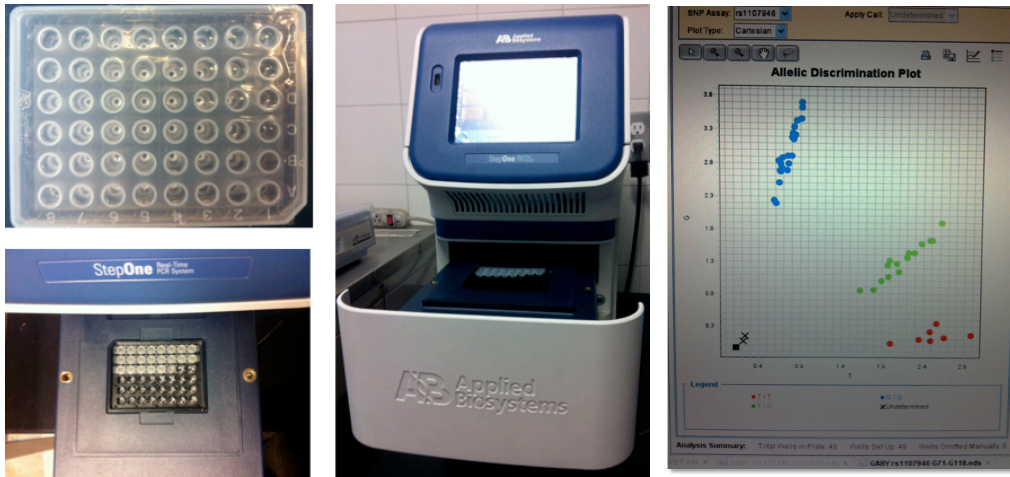
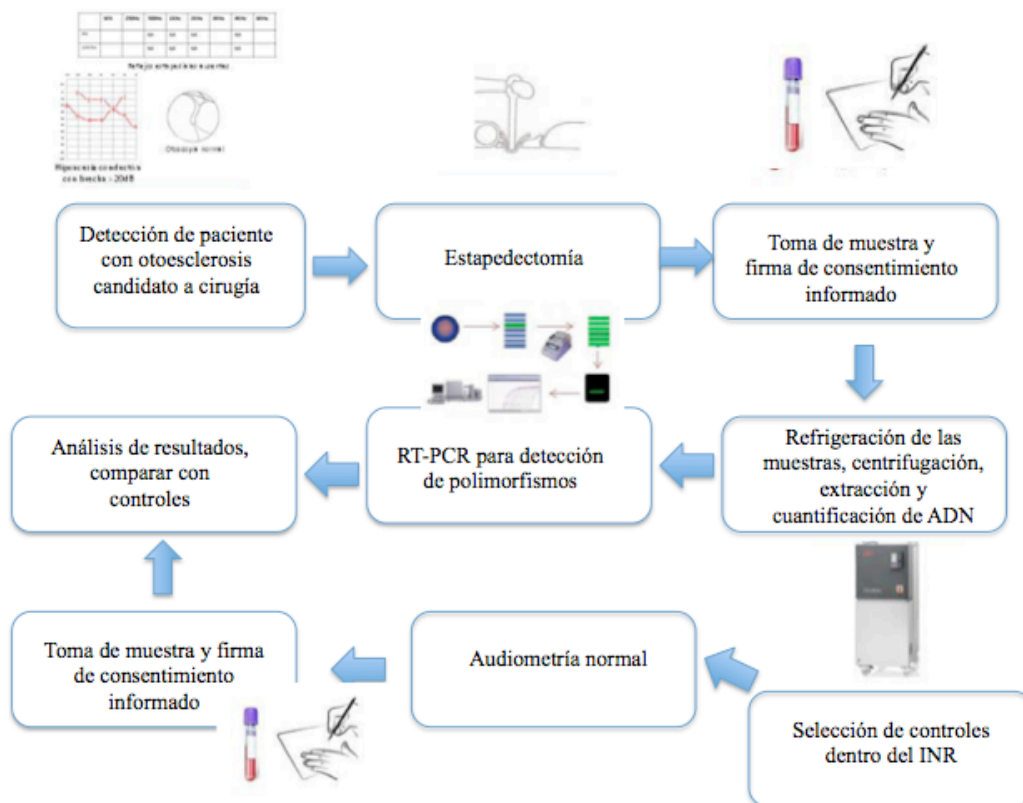


Figura 8. Tipo de placas y PCR-RT que se utilizó. En la imagen inferior se representa los resultados gráficos de la PCR-RT. En color azul los homocigotos para GG, en color rojo los homocigotos para TT y en color verde los heterocigotos (GT).

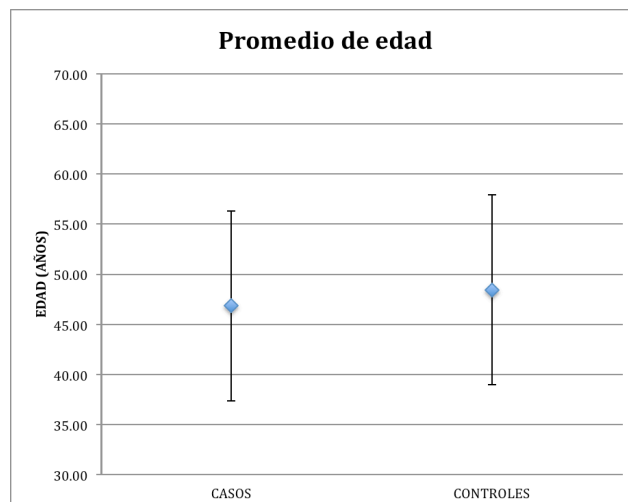
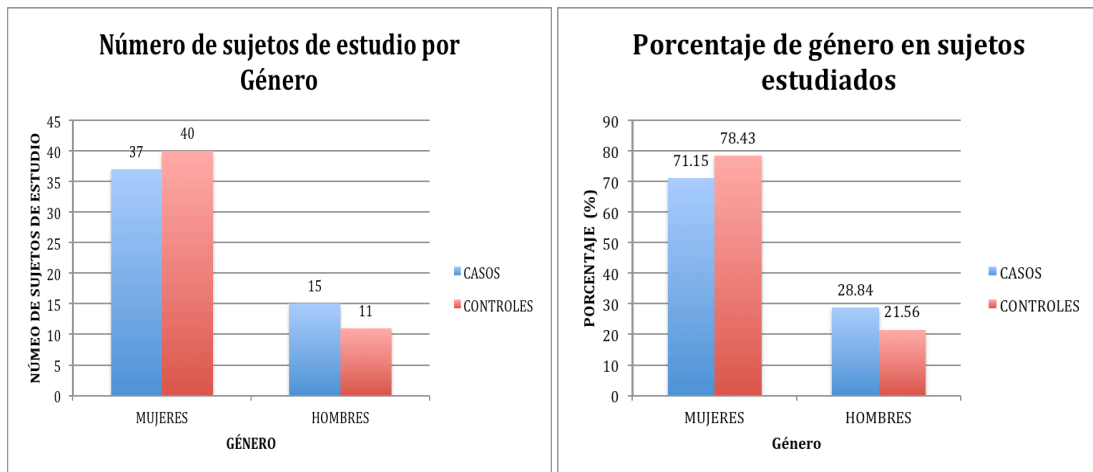
7.11 Flujograma de metodología



RESULTADOS

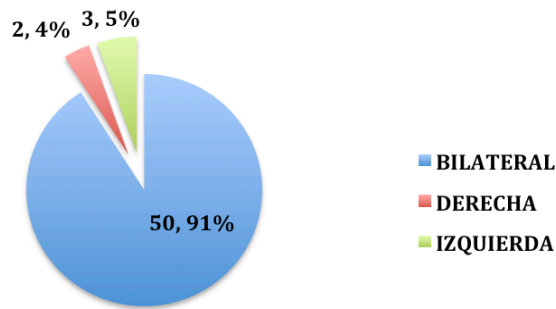
Se estudiaron 111 pacientes no relacionados entre sí, de los cuales se incluyeron 52 casos y 51 controles debido a que se eliminaron 3 casos y 5 controles por falta de reacción en la PCR-RT.

De los 52 casos, el 71% fueron mujeres y el 29% hombres; de los controles el 78% fueron mujeres y el 22% hombres. El promedio de edad para los casos fue de 46.72 ± 9.4 años (23-65), para los controles, el promedio de edad fue de 48.45 ± 10.71 años (24-75). La mediana de edad de los casos fue de 46 años y para los controles 37 años.

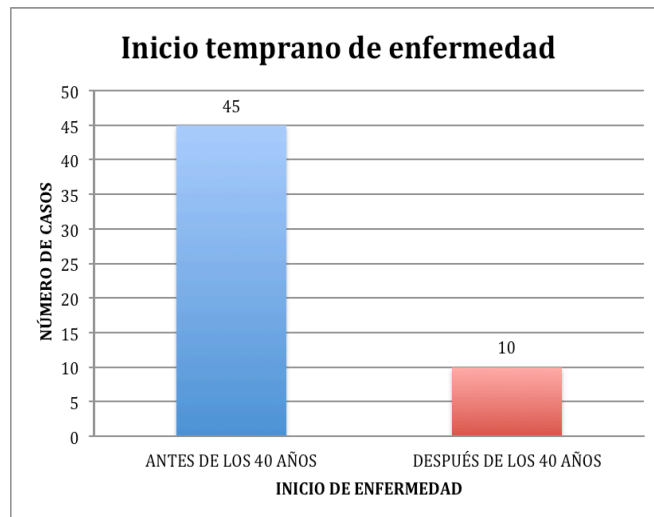


La enfermedad fue bilateral en 91% de los casos (50) y 9% unilateral (5), resultando más común del lado izquierdo (5%).

LATERALIDAD DE ENFERMEDAD (n,%)



En el 85% de los casos (44) la enfermedad inició antes de los 40 años de edad y en el 15% restante (8) inició posteriormente.



El tiempo de evolución de la enfermedad en promedio fue de 14.12 ± 9.7 años con una mediana de 11 años.

La brecha aéreo-ósea de los pacientes con otosclerosis fue en promedio de 27.58 ± 9.1 dB (rango 11.25-53.33).

El origen de los pacientes mexicanos con otosclerosis fue principalmente el Distrito Federal (74%) y Estado de México (13%); seguido por los estados de Veracruz (5%), Hidalgo (4%), Oaxaca y Puebla (2 por ciento).

Tabla 3. Frecuencia de genotipos por origen geográfico

ESTADO	NÚMERO DE PACIENTES	GENOTIPO
Distrito Federal	38	GG(11) GT(22) TT(5)
Estado de México	6	GG (3) GT(2) TT(1)
Veracruz	3	GT(3)
Hidalgo	2	GG (2)
Oaxaca	1	GG (1)
Puebla	1	GG (1)

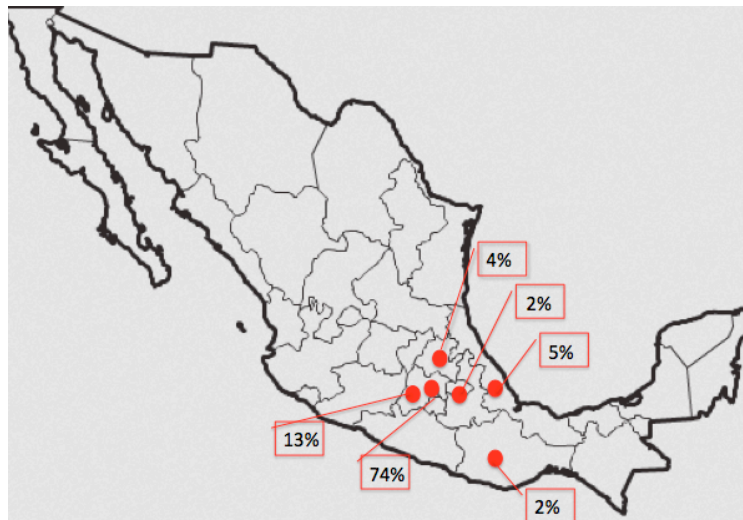


Figura 7. Representación geográfica del lugar de origen de los pacientes con otosclerosis, en porcentajes (N=52)

Se realizó un análisis de los tres genotipos estudiados: Guanina/Guanina (GG) Guanina/Timina (GT) y Timina/Timina (TT), siendo el alelo de Timina (T) la variación genética (polimorfismo) del gen COL1A1, tanto en el grupo de casos como en el grupo de controles, con la finalidad de estudiar si existe relación entre esta variación génica y la enfermedad. Se encontró que no existe asociación del polimorfismo rs 1107946 y la otosclerosis en el grupo de sujetos analizados ($p=0.38$); sin embargo al analizar el genotipo GG, se observa una tendencia de posible factor de protección para la enfermedad ($p=0.064$).

Se encontró que existe diferencia significativa entre el grupo con otosclerosis (casos) y el grupo control en relación al género ($p=0.026$). No existen diferencias significativas entre el grupo de pacientes con otosclerosis y el grupo control, respecto de la edad del sujeto y el tipo de genotipo encontrado en ambos grupos. Dentro del grupo de casos se analizó por genotipos: la edad de inicio de la enfermedad, el tiempo de evolución de

la enfermedad, la brecha aéreo-ósea total, brecha aéreo-ósea amplia, la biteralidad de la enfermedad, el antecedente familiar de hipoacusia, el antecedente de consanguinidad o endogamia, y el antecedente de sarampión, sin encontrar diferencias significativas.

De las 37 mujeres con otosclerosis (casos) únicamente 3 (8%) refirieron inicio o exacerbación de hipoacusia durante el embarazo.

De los 52 pacientes con otosclerosis, el 56% (29) correspondieron a casos familiares (con sospecha y confirmados) y el 44% (23) correspondieron a casos esporádicos.

DISCUSIÓN

La otosclerosis es una de las causas más comunes de hipoacusia adquirida y posee una predisposición hereditaria bien establecida, aproximadamente el 50% de los casos tienen familiares afectados confirmados. La evidencia más convincente de una causa genética subyacente de la otosclerosis son los gemelos monocigotos afectados, en los cuales se ha encontrado concordancia en casi todos los casos.^{32,34} Sin embargo, debido a que no existe información acerca de la transmisión genética de la otosclerosis histológica, no se sabe cuándo es que las bases de la herencia se relacionan con la formación de un foco otosclerótico, mismo que tiene tendencia a progresar. La mayoría de los estudios en familias con otosclerosis apoyan un patrón de transmisión autosómico dominante con una penetrancia incompleta. A pesar de que existe un fuerte componente familiar, varios estudios han reportado que la otosclerosis esporádica representa del 40-50% de los casos y no parece haber diferencia significativa en el grado de severidad entre los casos familiares y esporádicos.

En el presente estudio se encontró un porcentaje de 44% de casos esporádicos contra 56% de casos familiares. Confirmando lo descrito en la literatura.

Las similitudes clínicas e histopatológicas entre la otosclerosis y la osteogénesis imperfecta se han reconocido por muchos investigadores y han provocado especulaciones acerca de una etiología común. Estudios en las últimas décadas han mostrado que la osteogénesis imperfecta es un desorden genético causado por diferentes mutaciones en los genes COL1A1 y COL1A2. La hipoacusia que ocurre en sujetos con osteogénesis imperfecta tipo I sucede casi exclusivamente en asociación con defectos del gen COL1A1 y ocurre en solo el 50% de los afectados. Esta enfermedad comparte el mismo patrón de herencia autosómico dominante con

penetrancia incompleta reconocida en la otosclerosis. Dentro de los estudios en huesos temporales, cabe destacar a Nager que en 1988 reportó el hallazgo de un gran foco otosclerótico bilateral en un hueso temporal con osteogenesis imperfecta tipo I, sin más alteraciones otológicas; esto apoya la posibilidad de que la otosclerosis pueda ser la expresión fenotípica en los huesos temporales de variantes más leves de la osteogenesis imperfecta.

El impacto que generó la similitud clínica e histopatológica entre la osteogenesis imperfecta tipo I y la otosclerosis condujo a McKenna en 1998 a ser el primero que relacionó la enfermedad con el gen COL1A1, encontrando asociación significativa de algunos polimorfismos, sin embargo, el estudio que realizó se llevó a cabo en diferentes poblaciones con grupos control de distinto origen étnico, lo que disminuye la validez interna de su trabajo. Chen, en el 2007, reprodujo el estudio en población alemana y estadounidense encontrando también asociación significativa en uno de los polimorfismos estudiados (rs 11327935). Otro estudio reportó la asociación del gen COL1A1 con la otosclerosis en población española (Rodríguez y colaboradores en el 2004), sin embargo, no encontraron ningún resultado significativo. Khalafallah, en el 2011, estudió cuatro polimorfismos del gen COL1A1 y únicamente encontró asociación significativa del polimorfismo rs11327935 en mujeres y del rs2269336 en hombres, sugiriendo una asociación dependiente de género.

En nuestro estudio en población mexicana tampoco se encontró asociación, tanto en individuos del género femenino como del género masculino.

De la misma forma, en 1986 se identificó la similitud entre la enfermedad de Paget y la otosclerosis. Dado el hecho, de que dicha enfermedad se relaciona con una infección por paramixovirus, se inició la investigación acerca de una posible etiología viral de la otosclerosis. Recientemente Flores 2012, realizó un estudio como trabajo de tesis, en población mexicana en el cual no encontró ARN viral en las muestras de estribos por el método de PCR-RT, que incluso tiene una sensibilidad más alta que el convencional utilizado en otros estudios en donde sí lo detectaron.

Por otro lado, se sabe que la osteoporosis es un desorden metabólico que provoca reducción gradual de la densidad y fuerza ósea que predispone a los individuos afectados a fracturas. Se ha reportado en población con osteoporosis, hipoacusia conductiva similar a la otosclerosis. Se sabe que la osteoporosis está claramente asociada con el gen COL1A1, en particular con el polimorfismo Sp1 (rs 1800012) localizado en la región promotora del intrón 1, que favorece la transcripción del gen; estos hallazgos condujeron a McKenna en el 2004 a buscar la relación entre el polimorfismo Sp1 del gen COL1A1 y la otosclerosis, encontrando asociación

estadísticamente significativa. Posteriormente, en el 2012, Gezeery confirmó estos resultados en población egipcia.^{34,58}

La asociación clínica entre otosclerosis y osteoporosis no se ha explorado claramente, sin embargo, existen reportes de que los pacientes con osteoporosis tienen mayor incidencia de hipoacusia que la población general.^{56, 57}

Los resultados de este estudio muestran que en esta población estudiada no existe asociación entre la otosclerosis clínica y el polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1, sin embargo se observa una tendencia de posible protección a la enfermedad en la población analizada con el genotipo GG, que precisamente no contiene el polimorfismo estudiado, lo cual sugiere que el hecho de no tener el polimorfismo pudiera significar un factor protector de la otosclerosis; sin embargo, podría ser necesario una N mayor para demostrar el efecto protector.

Debido a la controversia en los resultados de los estudios ya realizados que sugieren asociación significativa entre la otosclerosis y el gen COL1A1, Schrauwen en el 2011 realiza un meta-análisis incluyendo a los estudios previamente citados. El autor consideró que los resultados son muy diversos debido al reducido tamaño de las muestras (50-200 individuos), es por eso que rehunió las muestras de los cinco estudios previos y analizó en conjunto a los 1,199 casos de otosclerosis con diferentes polimorfismos, obteniendo significancia en la asociación.⁵⁵ Esto apoya la teoría que sustenta al gen de la colágena como un factor de riesgo en el origen de la enfermedad, sin embargo, una de las más grandes limitantes de este estudio es que analizó en conjunto a diferentes poblaciones, lo cual disminuye la validez, pues la variabilidad genética de los individuos no es la misma en todas las zonas geográficas. Es por ello que sugerimos analizar una muestra mayor pero siempre de la misma población.

Es importante señalar que en los casos con genotipos GT y GG sí existen diferencias significativas ($p=0.001$ y $p=0.02$ respectivamente) por género, lo cual apoya que la enfermedad es más frecuente en mujeres. Llama la atención que en los casos con genotipo TT (homocigoto para el polimorfismo) no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, esto puede deberse a que la muestra es pequeña para este genotipo.

Por otro lado cabe mencionar que la mayoría de los casos tienen origen geográfico en el centro de la República, probablemente debido a la cercanía de la sede en este estudio, y se encontró que en la mayoría de los casos, independientemente del origen, los sujetos presentaron el genotipo GG (42.34%), lo cual sugiere menor prevalencia

del polimorfismo rs1107946 por lo menos en dicha zona geográfica. Actualmente no hay reportes publicados de la prevalencia del polimorfismo estudiado en la población mexicana, sin embargo en un estudio de polimorfismos asociados con osteoporosis que se está realizando en el Instituto Nacional de Rehabilitación, se incluyó un análisis en individuos mexicanos de población abierta (n=166) y se obtuvo una frecuencia de 33.13% para el alelo variante (T), mientras que las frecuencias genotípicas fueron GG:43.97%, GT:45.78% y TT:10.25%, resultados que se confirman en este estudio, tanto para el grupo de los casos como el de los controles.

Una de las limitantes del diseño de este estudio es que la edad de los controles es significativamente menor que la edad de los casos, lo cual explica la diferencia entre casos y controles por edad ($p=0.0001$). Esto se corroboró al aumentar el número de controles a 100 individuos, con muestras de pacientes previamente estudiados para el polimorfismo rs1107946 en relación a osteoporosis, ya que el promedio de edad de los controles se equiparó al promedio de edad de los casos y, por tanto, no se encontraron diferencias significativas.

Finalmente, cabe destacar que la otosclerosis inicia entre los 15 y 45 años.¹¹ En nuestro estudio se corrobora que la mayoría (86%) de los pacientes analizados inició su enfermedad antes de los 40 años, sin diferencias significativas de la edad de inicio entre géneros. En este estudio, únicamente 3 (8%) de los 38 casos del sexo femenino presentaron cambios (inicio o empeoramiento de hipoacusia) durante el embarazo, lo cual pone en duda la relación de la enfermedad con las hormonas sexuales femeninas, sin embargo, propone la posibilidad de un nuevo estudio.

CONCLUSIÓN

El polimorfismo rs 1107946 del gen COL1A1 no se asocia con la otosclerosis en el grupo de pacientes mexicanos estudiados. Deben existir diversas variaciones dentro del gen COL1A1 así como en otros genes involucrados en el metabolismo de la colágena, que generan una matriz extracelular inestable con una alta propensión por la remodelación ósea, ya demostrados en ciertas enfermedades como la osteogenesis imperfecta y la osteoporosis, sin embargo, continúa en controversia la asociación entre la otosclerosis y el gen de la colágena tipo I, debido a que han sido estudiados diferentes polimorfismos en distintas poblaciones, surgiendo resultados divergentes. Esto promueve el estudio de varios polimorfismos en una misma población con la finalidad de obtener resultados similares en razas en las que se sabe la otosclerosis es prevalente, como la caucásica, ya que la variabilidad genética es diferente en distintas poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guild SR Histologic Otosclerosis. *Ann Otol* 1944;53:246-67. Schrauwen I, Khalfallah A, Ealy M, et al. COL1A1 Association and Otosclerosis: A Meta-Analysis. *Am J Genet* 2012;158A:1066-1070.
2. Valsalva AM. *Valsalvae opera et Morgagni epistolae*. Venetiis Italy: Francescus Pitteri:1741. Cureoglu S, Schachern P, et al. Otosclerosis:etiopathogenesis and histopatology. *American Journal Of Otolaryngology Head and Neck Medicine and Surgery* 2006;27:334-40
3. Mudry A. Adam Politzer (1835-1920) and the description of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2006;27:276-281.
4. Gordon MA. The Genetics in otosclerosis: a review. *Am J Otol*. 1989;10:426-38.
5. Hueb MM, Goycoolea MV, Paparella MM, et al. Otosclerosis: The university of Minnesota temporal bone collection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;105:396-405
6. Schuknecht HF, Kirchner JC. Cochlear Otosclerosis: fact or fantasy?. *Laryngoscope* 1974;84:766-82.
7. Morrison AW. Genetic factors in Otosclerosis. *Ann R Coll Surg Engl* 1967;41:202-37. Hall JG. Otosclerosis in Norway a geographical and genetical study. *Acta Otolaryngol Suppl* 1974;324:1-20.
8. Ealy M, Chen W, Ryu G, et al. Gene expression analysis of human otosclerotic stapedial footplates. *Hearing Research* 2008;240:80-86
9. Schuknecht HF, Barber W, Histologic variants in otosclerosis. *Laryngoscope* 1985;95:1207-17.
10. Gristwood RE, Venables WN. Otosclerosis of oval window niche: an analysis of the results of surgery. *J Laryngol Otol* 1975;89:1185-217.
11. Manger DJ, Tange RA. The aetiology of Otosclerosis: a review of literature. *Clin Otolaryngol* 2003;28:112-120.
12. Parahy C, Linthicum FH Jr. Otosclerosis and otoespongiosis: clinical and histological comparisons. *Laryngoscope* 1984;94:508-12.
13. Wang PC, Merchant SN, McKenna et al. Does Otosclerosis occur only in the temporal bone? *Am J Otol* 1999;20:162-5.
14. Lim DJ, Robinson M, Saunders WH. Morphologic and immunohistochemical observation of Otosclerosis stapes: a preliminary study. *Am J Otolaryngol* 1987;8:282-95.
15. Manasse P. *Die Ostitis Chronica Metaplasica der Labyrinthkapsel*. Bergmann; 1912.
16. Causse J, Chevance LG. Enzymatic concept of otoespongiosis an cochlear otospongiosis. *Clin Otolaryngol* 1977;2:23-32.

17. Chevance LG, Causse J, Bretalau P et al. Hydrolytic activity of the perilymph in otosclerosis. A preliminary report. *Acta Otolaryngol* 1972;74:23-8.
18. Lindsay JR, Beal DD. Sensorineural deafness in Otosclerosis. Observations on Histopathology. *Ann Otol* 1966; 75:436-57.
19. Elonka DR, Applebaum EI. Otosclerotic involvement of cochlea: a histologic and audiologic study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1981;89:343-51.
20. Saim L, Nadol JB, Vestibular symptoms in otosclerosis- correlation of Otosclerotic involvement of vestibular apparatus and Scarpa's ganglion cell count. *Am J Otol* 1996;17:263-70.
21. Liston SL, Paparella MM, Mancini F et al. Otosclerosis and endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 1984;94:1003-7.
22. Powers WH, Sheehy JL, House HP. The fixed malleus head. A report of 35 cases. *Arch Otolaryngol* 1967;85:177-81. Moon CN Jr, Hahn MJ. Primary malleus fixation: diagnosis and treatment. *Laryngoscope* 1981;91:1298-307.
23. Lee T.C, Aviv RI et al. CT grading of otosclerosis. *Am J Neuroradiol.* 2009;30:435-39. Sakai O, Curtin HD, Hasso AN et al. Otosclerosis and dysplasias of the temporal bone. *Head Neck Surg* 2003;1245-73.
24. Quensel A, Moonis G, et al correlation of computed tomography with histopathology in otosclerosis. *Otol Neurotol.* 2012;34:22-28.
25. Lagleyre S, Sorentino T. et al. Reliability of high-resolution CT scan in diagnosis of Otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009;30:1152-1159.
26. Quesnel A. Third-Generation Bisphosphonates for Treatment of Sensorineural Hearing Loss in Otosclerosis *Otol Neurotol* 2012; 33:1308-1314.
27. Arnold W, Plester D. Active Otosclerosis of the stapes footplate: histological and clinical aspects of its influence of the perilymph. *Arch Otorhinolaryngol* 1977;215:159-78.
28. Flores García María de Lourdes. Determinación molecular del virus de sarampión en estribos de pacientes mexicanos con Otosclerosis. Tesis de especialidad en Otorrinolaringología. UNAM 2012.
29. Larson A. Otosclerosis: a genetic and clinical study. Early detection, medical management and prevention. *Am J Otol* 1984; 5:211-223.
30. Thys M, Van Camp G. Genetics in otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009;30:1021-1032. Ealy M, Smith R. The Genetics of Otosclerosis. *Hearing Research.* 2010;266:70-74.
31. Stankovic K, McKenna J. Current research in otosclerosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;14:347-351.
32. McKenna MJ et al. Association of COL1A1 and Otosclerosis. *Am J Otol.* 1998;19:104-610.

33. Manger DJ, Tange RA. The aetiology of Otosclerosis: a review of literature. *Clin Otolaryngol* 2003;28:112-120
34. McKenna MJ et al. Association of Otosclerosis with Sp1 Binding Site Polymorphism in COL1A1 Gene: Evidence for a shared genetic etiology with osteoporosis 2004;25:447-450.
35. Chen W. et al. Single nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis 2007;71:406-14.
36. Korkko J et al. Analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only COL1A1 mutations in 15 patients with osteogenesis imperfecta type 1: Identification of common sequences of null-allele mutations. *Am J Hum Genet* 1998;62:98-110.
37. McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, et al. Association of COL1A1 expression in fibroblasts from some patients with clinical Otosclerosis and those with type I osteogenesis imperfecta. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111:184-9.
38. Makareeva E, Cabral WA, Marini JC, Leikin S. Molecular mechanism of alpha 1(I)-osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome: unfolding of an N-anchor domain at the N-terminal end of the type I collagen triple helix. *J Biol Chem.* 2006 Mar 10;281(10):6463-70.
39. Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J Hum Genet.* 2000 Apr;66(4):1398-402. Epub 2000 Mar 17.
40. Pollitt R, McMahon R, Nunn J, Bamford R, Afifi A, Bishop N, Dalton A. Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Hum Mutat.* 2006 Jul;27(7):716.
41. Venturi G, Tedeschi E, Mottes M, Valli M, Camilot M, Viglio S, Antoniazzi F, Tatò L. Osteogenesis imperfecta: clinical, biochemical and molecular findings. *Clin Genet.* 2006 Aug;70(2):131-9. Erratum in: *Clin Genet.* 2006 Nov;70(5):455.
42. Shimizu A, O'Brien KP, Sjöblom T, Pietras K, Buchdunger E, Collins VP, Heldin CH, Dumanski JP, Ostman A. The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type I alpha1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3719-23.)
43. Simon MP, Navarro M, Roux D, Pouysségur J. Structural and functional analysis of a chimeric protein COL1A1-PDGFB generated by the translocation t(17;22)(q22;q13.1) in Dermatofibrosarcoma protuberans (DP). *Oncogene.* 2001 May 24;20(23):2965-75.
44. Gensure RC, Mäkitie O, Barclay C, Chan C, Depalma SR, Bastepe M, Abuzahra H, Couper R, Mundlos S, Silencio D, Ala Kokko L, Seidman JG, Cole WG, Jüppner H. A novel COL1A1 mutation in infantile cortical hyperostosis (Caffey disease) expands the spectrum of collagen-related disorders. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1250-7
45. Suphapeetiporn K, Tongkobpetch S, Mahayosnond A, Shotelersuk V. Expanding the phenotypic spectrum of Caffey disease. *Clin Genet.* 2007 Mar;71(3):280-4.

46. Cosío Villegas Emmanuel Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones, *Rev Inst Nal Enf Resp* 2007 20 (3): 213-221.
47. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:228-237.
48. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. Relation of an interleukin 10 promoter polymorphism to graft versus host disease and survival after hematopoietic cell transplantation. *N Engl J Med* 2003;349:2201-2210
49. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 1995; 11:1005-1011.
50. Duan J, Wainwright MS, Cameron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003;12:205-216.
51. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999;22:231-238.
52. ST Sherry et al. db SNP: the NCBI database of genetic variation, *Nucleic Acid Research* 2001, 29 (1): 308-31.
53. Sherry et al, db SNP Database for Single Nucleotide Polymorphism and Other Classes of Minor Genetic Variation, *Genome Res.* 1999 9: 677-679.
54. Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999;65:220-228.
55. Schrauwen I, Khalfallah A, Ealy M, Franssen E, Claes C, Huber A, Murillo LR, Masmoudi S, Smith RJH, Van Camp G. 2012. COL1A1 association and otosclerosis: A meta-analysis. *Am J Med Genet Part A* 158A:1066–1070.
56. Haboubi NY, Hudson PR. Factors associated with Colles fracture in the elderly. *Gerontology* 1991;37:335-338.
57. Clark K. Sowers MR, Wallace RB et al. Age-related hearing loss and bone mass in a population of rural women aged 60-85 years. *Ann Epidemiol* 1995;5:8-14.
58. Amina El Gezzery et al. Otosclerosis: association of COL1A1 Sp1 binding site polymorphism in Alexandria, Egypt. *Asian Biomedicine.* 2012;6:747-752.
59. ISO 8253-1:1989 Acoustics- Audiometrics test methods. Part 1: basic pure tone air and bone conduction threshold audiometry.
60. ISO 389-1: 1998: Acoustics-Reference zero for the calibration of audiometric equipment.

Anexo 1

CONCEPTOS BÁSICOS AUDIOMETRÍA

a. Audiómetro de tono puro: Instrumento electroacústico, equipado con auriculares que proporciona tonos puros de frecuencias especiales a niveles de presión sonora conocidos, adicionalmente, el instrumento puede estar equipado con un vibrador óseo y/o un sistema de enmascaramiento.

b. Audiómetro manual: Audiómetro en que la presentación de la señal, selección de frecuencia, nivel de presión sonora y registro de los resultados se efectúan manualmente.

c. Conducción aérea o conducción por vía aérea: Transmisión del sonido a través del oído externo y medio, hacia el oído interno.

d. Nivel de audición de un tono puro: Para una frecuencia específica, para un tipo específico de transductor y para una forma específica de aplicación, es el nivel de presión sonora (o nivel de fuerza vibratoria) de un tono puro, producido por el transductor en un oído artificial o acoplado acústico (o acoplado mecánico) especificados, menos el nivel de presión sonora umbral equivalente de referencia (o nivel de fuerza umbral equivalente de referencia) correspondiente. Su unidad de medición es el dB.

e. Umbral de audición: Es el nivel de presión sonora o nivel de fuerza vibratoria más bajo, para el cual en condiciones específicas, una persona entrega un porcentaje predeterminado de respuestas de detección correctas de pruebas repetidas.

f. Nivel umbral de audición de un oído dado: El umbral de audición, es una frecuencia expresado como nivel de audición (en una frecuencia especificada y para un tipo específico de transductor).

g. Audiograma de tono puro de un sujeto: Presentación gráfica o en forma tabulada de los umbrales de audición, determinados bajo condiciones específicas y por métodos específicos en función de la frecuencia estudiada.

h. Audiometría: Permite obtener un diagnóstico respecto al tipo de hipoacusia que presenta el sujeto. Consiste en realizar un estudio completo (umbrales aéreos, óseos logo-audiometría) y exámenes auditivos complementarios si fuera necesario.

i. Diapasones: Aparatos metálicos que al vibrar producen un tono puro. Cada diapasón produce un tono determinado, dicho tono dependerá del grosor, según éste vibrará más rápido o más lento, determinando cierta frecuencia de sonido que va desde los 128 a 2048 ciclos por segundos, los más usados son los que registran 256 y 512 Hz.

j. Cámara o cabina audiométrica: Es el lugar especialmente diseñado para proporcionar en su interior un ambiente de insonoridad para la ejecución de exámenes de tipo audiométrico. El nivel del ruido de fondo en su interior no debe exceder los criterios establecidos según la especificidad de la audiometría, debiendo estar equipada con un sistema de ventilación que permita la renovación de aire en su

interior. Tanto la sala y cabina audiométrica, deberán ser acreditadas o certificadas por el ente competente en normalización nacional o internacional.

k. Sala de audiometría: Sala acondicionada y destinada en forma exclusiva a la ejecución de exámenes audiométricos y en cuyo interior se ubica una cámara audiométrica.

REQUISITOS BÁSICOS DEL OPERADOR

- a. Médico especialista en audiología debidamente entrenado
- b. Médico Otorrinolaringólogo debidamente entrenado
- c. Enfermera debidamente entrenada
- d. Técnico debidamente entrenado
- e. Médico debidamente entrenado

REQUISITOS PARA LOS AUDIÓMETROS.

El audiómetro debe cumplir como mínimo con los requerimientos técnicos para un audiómetro de tipo 2, según norma oficial de salud.

a. Revisiones de Rutina del Audiómetro: El chequeo rutinario tiene como finalidad detectar los sonidos indeseables generados por éste, incluyendo los auriculares, además de mantener en buen estado todos sus accesorios. Las revisiones deberán ser periódicas y se lleva un registro semanal, con un perfil conocido de un sujeto de prueba cuyo umbral no exceda de los 25 dB HL. Si los resultados indican diferencias en el nivel umbral de audición superior a 10 dB HL en cualquier frecuencia, el audiómetro se deberá someter a una calibración básica área y ósea de todo los parámetros especificados. Esta calibración debe efectuarse cada cuatro años como mínimo o cuando se juzgue necesario como resultado de las revisiones periódicas señalizadas anteriormente.

REQUISITOS PARA LAS CÁMARAS AUDIOMÉTRICAS

La cámara audiométrica deberá estar equipada con un sistema de ventilación que permita la renovación del aire en su interior. Para la determinación de los niveles de ruido ambiental al interior de la cámara en las condiciones usuales de funcionamiento, se deberá tomar como referencia la norma oficial.

CONDICIONES DEL LABORATORIO AUDIOLÓGICO

Deberá mantener una condición adecuada de insonorización, de tal forma que no afecte los niveles de ruido de fondo que debe tener la cabina audiométrica según lo establecido en la norma en mención.

Procedimiento de la evaluación audiométrica:

a. Otoscopía: Al paciente se le debe practicar una otoscopía, para verificar que sus conductos se encuentren permeables y no exista patología de los mismos.

Si se comprueba la presencia de tapón de cerumen, inflamación o supuración del conducto y/u oído medio, no se realizará el examen audiométrico y el paciente deberá

ser derivado al otorrinolaringólogo para su tratamiento.

b. Diapasones: Al paciente también se le realizará el examen con diapasones de 250, 500 y 1000 Hz., pruebas de Rinne y Weber. Determinando un diagnóstico previo del estado de los oídos.

c. Evaluación audiométrica: La evaluación propiamente dicha se iniciará con las indicaciones e instrucciones que se le impartirá al paciente evaluado:

c.1. Indicar al sujeto que en cada oído y por separado oír diferentes sonidos así como cuál oído será estudiado primero, ante dichos sonidos él deberá manifestar que los escucha, hasta los más tenues que sea capaz de oír.

c.2. La forma de respuesta de su percepción sonora será oprimiendo el botón de respuesta del equipo o en todo caso se le indicará que la respuesta debe ser levantado el brazo del lado del oído estudiado cada vez que escuche el sonido, esto dependiendo del tipo de respuesta que el evaluador crea conveniente o también según sea el equipo utilizado.

c.3. Una vez instalados los auriculares en los oídos del paciente y consultado acerca de si los siente confortables, éste debe tener claro que no debe manipularlos durante toda la prueba. Por protocolo se utilizará el color rojo para el lado derecho y el color azul para el lado izquierdo.

c.4. Se señalará al paciente que recibirá un tono de prueba para familiarizarlo con las características de los sonidos que escuchará, solicitándole mantener al máximo su grado de atención ante los sonidos que escucha.

c.5. Se pedirá al paciente que evite durante la evaluación movimientos innecesarios de su cuerpo, con el propósito de disminuir ruidos ajenos al procedimiento que dificulte su percepción.

c.6. Consultar al paciente si tuviera dudas de lo explicado e instruido de la evaluación. Si tuviera dudas deberá explicarle la paciente al respecto.

d. Procedimiento durante la evaluación: El estudio audiométrico se iniciará por el oído subjetivamente mejor que señale el sujeto durante la anamnesis y que esté relacionado con la prueba de diapasones.

Se realizará la obtención de los umbrales aéreos y óseos según método ascendente que comienza a nivel infra umbral y se comienza a ascender de 5 en 5 dB hasta que el sujeto indica oír el estímulo de las cinco veces presentes en el mismo nivel.

Método descendente: se comienza a nivel supra umbral y se comienza a descender de 5 en 5 dB hasta que el sujeto indica oír tres de las cinco veces presentadas en el mismo nivel.

Método mixto: se comienza a nivel supra umbral y se comienza a descender de 10 en 10 dB hasta que el sujeto indica no oír, allí se comienza a ascender de 5 en 5 dB hasta que el sujeto indica oír, se procede a descender nuevamente de 10 en 10 dB, hasta que el sujeto indica oír el estímulo tres de las cinco veces presentes en el mismo nivel.

Los umbrales auditivos se determinarán para cada frecuencia y oído, incluyendo obligatoriamente para la vía aérea las frecuencias 125, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 y 8000 Hz y las frecuencias de 250, 500, 1000, 2000, 3000 y 4000 Hz para la vía ósea.

Debe existir un correcto enmascaramiento de acuerdo a la obtención de los umbrales y una coherencia audiológica entre los mismos, es decir, deben corresponder a patologías otoneurológicas, según sea el caso.

Asimismo, se deberá realizar una logaudiometría que permitirá evaluar las habilidades del sujeto para entender la palabra y, a partir de esto, la habilidad comunicacional que el individuo posee.

Dentro de estas pruebas a evaluar tendremos:












e. Umbrales de detección de la palabra (SDT): el cual indica el nivel mínimo de intensidad al cual el sujeto detecta dos veces la voz, de 304 palabras, sin discriminar. Se relaciona con los umbrales de sensibilidad de tonos puros de las dos mejores frecuencias 250 y 4000 Hz. La técnica recomendada es el método descendente.

f. Umbrales de reconocimiento de la palabra (SRT): el cual determina el mínimo nivel de intensidad al cual el sujeto repite correctamente el 50% de las palabras presentadas (disílabos o palabras compuestas). Se sugiere considerar un criterio de 2 de 4 palabras repetidas correctamente. La técnica puede ser descendente o ascendente. Las utilidades del SRT son: corroborar los umbrales de tonos puros, determinar un índice de sensibilidad auditiva para la palabra y determinar los niveles para aplicar las pruebas supraumbrales de discriminación de la palabra.

g. Umbrales de máxima discriminación (UMD): Se determina el nivel de intensidad al cual se obtiene el máximo de discriminación del sujeto y se expresa en el porcentaje de las palabras repetidas correctamente de una lista de palabras. La técnica es usar 20 - 30 dB sonora el SRT, dependiendo del perfil audiométrico.

h. De los resultados: Las mediciones serán consignadas en la audiometría, en original y copia, sustentados y firmados por el operador que realizó la evaluación y remitidas al expediente electrónico.

Los resultados obtenidos en la audiometría deben tener concordancia con la historia audiológica del sujeto, de lo contrario, se revisará lo realizado.^{59,60}

SIMBOLO	SIGNIFICADO	
	Umbral aéreo oído derecho	Indica el nivel de audición del oído cuando el sonido ha entrado por el conducto auditivo externo y ha llegado hasta el oído interno
	Umbral aéreo oído izquierdo	
	Umbral aéreo oído derecho enmascarado	Indica el nivel de audición cuando ha sido necesario enmascarar el oído contra lateral para asegurarse de que el umbral medido corresponde al umbral del oído que se está examinando
	Umbral aéreo oído izquierdo enmascarado	
	Vía ósea oído derecho sin enmascarar	Indica el nivel de audición del oído cuando la cóclea es estimulada por vía ósea, es decir el sonido no pasa por oído externo y medio
	Vía ósea oído izquierdo sin enmascarar	
	Vía ósea oído derecho enmascarada	En este caso para medir el nivel de audición por vía ósea, fue necesario poner un ruido en el oído contra lateral para asegurarse que el umbral medido corresponde al umbral del oído examinado
	Vía ósea oído izquierdo enmascarada	
	Umbral de molestia de oído derecho	Indica el nivel de sonido que le resulta molesto al paciente según oído, la prueba se llama LDL del inglés Loudness Discomfort Level
	Umbral de molestia del oído izquierdo	
	No existe el umbral en oído derecho	Cuando uno de los símbolos aparece con una flecha, como la indicada, significa que a la intensidad en que está anotado el umbral, el sujeto no responde
	No existe el umbral en oído izquierdo	

Fuente: GUÍA PRÁCTICA PARA LA INTERPRETACIÓN DE EXÁMENES AUDITIVOS Prof. T.M. CORINA FARFAN REYES Mg SP, Chile 2007

Anexo 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

SUBDIRECCIÓN DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO

CARTA DE DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMO RS1107946 DEL GEN COL1A1 EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS CON OTOSCLEROSIS

Usted que padece sordera a causa de una mala transmisión del sonido por fijación de uno de los huesos del oído (otosclerosis), le invitamos a participar en un estudio clínico en el cual se evaluará la presencia de polimorfismos (variaciones genéticas) del gen COL1A1 para determinar si este es uno de los causantes de la enfermedad. Su participación es completamente voluntaria. Nadie puede inducirlo o forzarlo para que participe. Por favor, lea la información siguiente; si no le es posible, alguien más puede leerla. Revísela con cuidado y si existe cualquier duda o pregunta, hágalo saber a la persona que está revisando este documento con usted.

¿Por qué se hace este estudio?

Existen varias teorías sobre la causa de la otosclerosis, como la hereditaria, hormonal, del sistema de defensa, desórdenes del hueso y la viral, sin embargo, no existe ninguna totalmente comprobada como única causante por lo que se realiza este estudio para descartar o reafirmar una de las teorías causales, como es el involucro de uno o varios polimorfismos del gen COL1A1 en la etiopatogenia de la otosclerosis.

¿Quién está haciendo este estudio?

Este estudio se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación, justo donde se encuentra hospitalizado. En este hospital, la responsable del estudio es la Dra. Margarita Valdés, a quien puede contactar para cualquier duda o aclaración en el teléfono 59991000 ext. 19403.

¿Qué se le hará a usted en este estudio?

Usted recibió el tratamiento quirúrgico recomendado para el tratamiento de la otosclerosis, luego de la cirugía se le tomará una muestra de sangre para analizar únicamente las células que contienen ADN (información genética).

¿Qué se hará con las muestras?

Las muestras tomadas para conocer la presencia de polimorfismos (variaciones en la información genética) del gen de la colágena tipo 1, se analizarán con pruebas moleculares y se realizará una base de datos con los resultados.

¿Cuáles son los riesgos que tengo por participar?

No existen riesgos adicionales al de la propia cirugía por participar en este estudio.

¿Cuáles son los beneficios de participar?

Participar en el estudio puede beneficiar de forma directa a usted y su familiares ya que tendremos un mejor conocimiento de este padecimiento, lo que nos ayudará a mejorar el tratamiento de los pacientes afectados en el futuro.

No se ofrece ningún pago a los participantes durante el estudio.

¿Puedo retirarme del estudio?

Si, puede pedir que sea retirado/a de forma libre en el momento que lo decidiera y el Comité de Ética del Instituto tiene la obligación de detener el estudio en cualquier momento cuando considere que se están afectando los derechos de los pacientes.

¿Qué sucede si decido no participar o si posteriormente decido retirarme del estudio?

No existe ningún problema. Los médicos respetarán su decisión y continuarán ofreciéndole el tratamiento y atención acostumbrados en el hospital.

Confidencialidad.

Toda la información acerca de usted se mantendrá confidencial y no se compartirá con ninguna persona que no sea responsable de su cuidado médico. El expediente médico será revisado por personas que trabajan dentro del estudio, incluyendo monitores, y puede ser revisado por autoridades regulatorias y el Comité de Ética. El nombre no será utilizado en ningún reporte de la información generada en este estudio. Todos los documentos de investigación y muestras se identificarán utilizando un número clave. El nombre no aparecerá en ningún reporte o publicación científica relacionada con el estudio.

¿A quién puedo contactar si tengo preguntas o quejas?

Si tienen cualquier pregunta acerca del estudio, puede hablar con la investigadora principal, la Dra. Margarita Valdés, o, si tiene dudas en relación al proceso de consentimiento informado, con el coordinador el Comité de Ética de su hospital.



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN



SUBDIRECCIÓN DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMO RS1107946 DEL GEN COL1A1 EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS CON OTOSCLEROSIS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

_____/_____/_____
Nombre del paciente Firma día mes año

_____/_____/_____
Nombre del testigo 1 Firma día mes año

Relación con el participante Domicilio

_____/_____/_____
Nombre del testigo 2 Firma día mes año

Relación con el participante Domicilio

_____/_____/_____
Nombre del Investigador Firma día mes año

Av. México-Xochimilco #289
Col. Arenal de Guadalupe
Tlalpan, 14389, México D.F.