



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MÉDICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

SECRETARIA DE SALUD

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
Ismael Cosío Villegas**

**ESPECIALIDAD EN OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGIA DE
CABEZA Y CUELLO**

**“EXPRESIÓN DE FACTORES PROINFLAMATORIOS, ANTIINFLAMATORIOS,
DE PROLIFERACIÓN Y SENESCENCIA EN UNA COHORTE DE PACIENTES
CON OTOESCLEROSIS”**

TESIS

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
MEDICO ESPECIALISTA EN:**

OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO

**P R E S E N T A
DRA. MARIA ELBA OSORIO NECOECHEA**

PROFESOR TITULAR:

DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ

ASESOR:

DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA

CIUDAD DE MÉXICO .

AGOSTO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



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. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DRA. MARGARITA FERNANDEZ VEGA
SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. MARÍA DEL CARMEN CANO SALAS
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE FORMACION DE POSGRADO

DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ
MÉDICO ADSCRITO DEL SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGIA
ASESOR DE TESIS

DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA
ASESOR DE TESIS Y METODOLÓGICO

INDICE

RESUMEN DEL PROYECTO	4
ANTECEDENTES.....	6
JUSTIFICACION.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
MATERIAL Y METODOS.....	13
DESCRIPCIÓN DEL UNIVERSO DE TRABAJO.....	13
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	14
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	14
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	14
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	22
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSION.....	45
ANEXOS	46
BIBLIOGRAFÍA.....	48

“EXPRESIÓN DE FACTORES PROINFLAMATORIOS, ANTIINFLAMATORIOS, DE PROLIFERACIÓN Y SENESCENCIA EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON OTOESCLEROSIS”

AUTORES: María Elba Osorio Necochea

RESUMEN DEL PROYECTO

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de Ki-67/p16^{INK4α}, IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺, CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺, MMP9/TIMP-1, IL-8/TNF- α , TGF- β 1 y BMP_{2/4} en platinas con otoposclerosis; así como el porcentaje de células circulantes Th22 (CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-22⁺), Th17 (CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-17A⁺), Th2 (CD14⁻/CD3⁺/CD4⁺/IL-4⁺), Th1 (CD14⁻/CD3⁺/CD4⁺/IFN- γ ⁺), de células T reguladoras (CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺), de Bregs (CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺) y pDCs (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺) en pacientes con otoposclerosis.

Tipo de Estudio: transversal, no aleatorio, de cohorte

Metodología: Se incluyeron 11 pacientes con diagnóstico de otoposclerosis, que se encontraban programados para estapedectomía, la platina que se extrajo por la cirugía de rutina se obtuvo el material que se empleó para el análisis por inmunohistoquímica. Asimismo, se extrajo una muestra de 10 mL de sangre periférica para la evaluación citométrica de las subpoblaciones de células T CD4 y reguladoras.

Como grupo control de las células mononucleares de sangre periférica, se incluyó la muestra de 10 voluntarios sanos con normoacusia evaluada por audiometría.

Resultados: Se reclutaron un total de 11 pacientes con otoposclerosis y 10 donadores sanos y normoacúsicos. De los pacientes con otoposclerosis 8 fueron mujeres (73%) y 3 hombres (27%), con un promedio de edad de 46 años.

La distribución de los hallazgos anatomo-patológicos mostró preponderancia de platinas (Grado IV) en el 64% de las muestras analizadas seguidas del grado III en el 18% y del grado I y II en el 9% de los casos.

La evaluación por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de células T mostró que las células Th22, Th17, Th2 y Th1 de sangre periférica de los pacientes con otoesclerosis se encontraban aumentadas en comparación con el grupo control de individuos sanos. Las células Tregs y las pDCregs presentaron una disminución estadísticamente significativa en los pacientes con otoesclerosis vs. los controles,

En platinas de pacientes con otoesclerosis el factor de necrosis TNF- α , su expresión fue menor al 3%. El nivel de células productoras de IL-17A fue mayor al 5%. Se presentó un porcentaje considerable de linfocitos productores de IFN- γ . La IL-22 se encontró abundantemente expresada. La expresión de la IL-8 en la platina de los pacientes con otoesclerosis fue prácticamente nula. La IL-4 se presentó en un número no mayor al 3% en los vasos sanguíneos. El TGF- β 1 se determinó con una abundante expresión a nivel perivascular. La proteína morfogenética del hueso BMP_{2/4} es un factor de crecimiento que pertenece a la familia del TGF- β , tiene la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo, cartílago y tejido conjuntivo. El BMP_{2/4} se encuentra predominantemente expresado en los vasos sanguíneos de las platinas de los pacientes con otoesclerosis. Las células Tregs se presentaron con un número menor al 3%. Se encontró un porcentaje relativo de células B productoras de IL-10 menor al 1%. La MMP-9 presentó un número de células inmunorreactivas al parénquima menor al 2%. La proliferación de las células de la platina de los pacientes con otoesclerosis fue prácticamente nula. La senescencia celular se presentó en un número menor al 2%.

Conclusiones: Se conocen múltiples factores asociados a la otoesclerosis sin embargo falta un largo camino por dilucidar acerca de los mecanismos involucrados en su presentación y progreso, el conocer las citosinas involucradas nos amplía el campo de trabajo para conocer el papel que juegan cada una en esta patología.

ANTECEDENTES:

La otoesclerosis es una enfermedad de remodelación del hueso de la cápsula ótica humana que lleva a una hipoacusia progresiva conductiva o sensorineural, como consecuencia de la fijación de la platina del estribo y reabsorción ósea coclear con involucro del endostio. La prevalencia clínica de la otoesclerosis es de 0,3- 0,4% en la población general, de estos el 18 al 22% tienen hipoacusia conductiva [1, 2]. El desarrollo de focos de otoesclerosis subclínicos puede ser mucho más común que la otoesclerosis. La otoesclerosis histológicamente ha sido reportada en 8-11% de grandes series de autopsias, con ausencia de datos clínicos. [1]

La hipoacusia es progresiva usualmente es bilateral y aparece de manera predominante en la tercera a quinta década de la vida, la prevalencia es 2-3 veces más frecuente en mujeres que en hombres por los factores hormonales atribuidos. Se han propuesto varias teorías acerca de la etiología que sugieren un origen viral, autoinmune o endocrino. Desde hace mas de 25 años, se ha asociado fuertemente el virus del sarampión como agente infeccioso disparador de la enfermedad. Actualmente su presencia y relación causa-efecto se ha confirmado por estudios histológicos. [3, 5]

La progresión clínica de la enfermedad es impredecible y variante, esto debido a múltiples causas entre las cuales el factor hereditario juega un papel importante. [6] La heredabilidad se describe con un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta, con un 40-50%; sin embargo se han encontrado diversos locus asociados a la enfermedad. [7, 8]

La remodelación ósea otoesclerótica muestra un organotropismo de la cápsula ótica y la platina del estribo donde la osificación es endocondral.

El sistema óseo está constantemente en remodelación con un balance mantenido entre la actividad osteogénica de los osteoblastos y la actividad resortiva de los

osteoclastos. [9] El proceso de renovación ósea puede ser complejo debido a la participación de numerosos mediadores inflamatorios que pueden alterar las funciones celulares, El principal mediador inflamatorio involucrado es el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). [10]

El primer miembro descrito de la superfamilia del TNF fue el TNF- α , mediador esencial de la inmunidad innata y adquirida, importante en el desarrollo del sistema inmune, apoptosis, tiene potente actividad resorptiva, ya que estimula la diferenciación y la actividad de los osteoclastos e inhibe la diferenciación de los osteoblastos. [1, 5, 11, 12, 13]

El TNF ejerce sus efectos biológicos a través de dos receptores de membrana: TNF 1 o p55 (TNFR1) y receptor de TNF 2 o p75 (TNFR2), en el sistema inmune TNFR1 primordialmente modula la citotoxicidad y la secreción de citoquinas, mientras que el TNFR2 está asociado con la linfoproliferación y la activación de las células T. En el hueso ambos receptores están expresados en los osteoclastos, mientras que los osteoblastos expresan solo TNFR1.

El NF- κ B regula la expresión de los genes involucrados en la inflamación y en la inmunidad y su activación crónica está relacionada con múltiples enfermedades autoinmunes humanas y cáncer. Bajo condiciones normales, la activación de NF- κ B es transitoria y controlada. El inhibidor de NF- κ B (I κ B) mantiene inactivo NF- κ B en el citoplasma de las células que no han sido estimuladas. [14]

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LA OTOESCLEROSIS

Se presentan lesiones osteolíticas focales con alta celularidad y vascularización en regiones pericocleares (35%), perilaberínticas (15%), áreas adyacentes a la ventana oval (90%) y la ventana redonda (40%), así como la platina del estribo (95%). La clasificación histológica del foco de otoesclerosis establecida por Iyer V y cols. (Histopathology of the stapes in otosclerosis. Pathology 1984) describe cuatro grados, el **G1** presenta engrosamiento y distorsión de la platina del estribo,

GII es algo similar excepto por las células típicas semejantes al osteoclasto, las células multinucleares están ausentes, **GIII** está representado predominantemente por un entramado de hueso eosinofílico que contiene algunas estructuras lamelares, **GIV** se encuentra una estructura ósea lamelar remodelada con hipocelularidad y avascularización. [15]

CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA DE LA OTOESCLEROSIS

En el estudio de Giuseppe Malafronte en 2008, donde se evaluaron las características macroscópicas de la platina otoesclerótica se propone la siguiente clasificación con fines pronósticos en relación a la cirugía: 1. Otoesclerosis azul (platina azul) 2. Otoesclerosis blanca (platina blanca) 3. otoesclerosis obliterativa (platina no visible), esta clasificación puede ser útil antes de hacer maniobras sobre el estribo, dando tres diferentes grados de dificultad de la cirugía: Grado I: Otoesclerosis azul, Grado II Otoesclerosis blanca, Grado III Otoesclerosis Obliterativa. [16]

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la cirugía es la principal herramienta terapéutica si bien no curativa debido a las características inmunes e inflamatorias progresivas de la enfermedad; la estapedectomía mejora la hipoacusia en pacientes con otosclerosis de forma temporal. Sin embargo, esta no es una terapéutica aplicable a toda la población con diagnóstico de otosclerosis y tampoco es el tratamiento definitivo.

Existen condiciones y circunstancias de los pacientes con otosclerosis que exigen nuevas opciones terapéuticas como son los de pacientes con alguna contraindicación para la realización del procedimiento quirúrgico (otosclerosis coclear), la otosclerosis juvenil (que es la expresión más agresiva de la enfermedad), las fases tempranas de la otosclerosis con actividad osteoblástica muy activa e hipoacusia leve, los pacientes postoperados que presentan aumento en el grado de la hipoacusia como expresión clínica de la progresión de la enfermedad y porque que la terapéutica actual no es curativa de forma permanente. Debido a esto, resulta imperativo el estudio fisiopatogénico de la otosclerosis, con un enfoque al aspecto inmunológico, inflamatorio y del metabolismo óseo ya que una vez identificados los mediadores inflamatorios que participan en el desarrollo de la inflamación en la otosclerosis, éstos podrán ser considerados como posibles blancos terapéuticos mediante el empleo de medicamentos con acción inmunomoduladora y antiosteoporótica.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existen células y mediadores inflamatorios (IL-8/TNF- α , IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺), mecanismos reguladores (CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺), así como remodelación tisular (MMP9/MMP2) y/o fibrosis (TGF- β 1, BMP_{2/4}, CD4⁺/IL-4⁺), proliferación celular y/o senescencia (Ki-67/p16^{INK4 α}) en las platinas de los pacientes con otopresclerosis?

HIPÓTESIS

H1: En la platina de los pacientes con otoesclerosis se presentan células y mediadores inflamatorios (IL-8/TNF- α , IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺), mecanismos reguladores (CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺), así como remodelación tisular (MMP9/MMP2) y/o fibrosis (TGF- β 1, BMP_{2/4}, CD4⁺/IL-4⁺), proliferación celular y/o senescencia (Ki-67/p16^{INK4 α}).

H0: En la platina de los pacientes con otoesclerosis no se presentan células y mediadores inflamatorios (IL-8/TNF- α , IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺), mecanismos reguladores (CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺), así como remodelación tisular (MMP9/MMP2) y/o fibrosis (TGF- β 1, BMP_{2/4}, CD4⁺/IL-4⁺), proliferación celular y/o senescencia (Ki-67/p16^{INK4 α}).

OBJETIVO GENERAL

PRINCIPAL

Determinar los mediadores y células inflamatorias, antiinflamatorias, los mecanismos de remodelación tisular y/o fibrosis así como la proliferación celular y senescencia en las platinas y en las células mononucleares sangre venosa de los pacientes con otopresclerosis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el porcentaje de células Th22 (CD3⁺/CD4⁺/CD161⁻/IL-22⁺), Th17 (CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-17A⁺), Th2 (CD14⁻/CD3⁺/CD4⁺/IL-4⁺), Th1 (CD14⁻/CD3⁺/CD4⁺/IFN- γ ⁺), de células T reguladoras (CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺), de Bregs (CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺) y pDCs (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con otopresclerosis e individuos sanos.

Cuantificar la expresión de Ki-67/p16^{INK4 α} , IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺, CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺, MMP9/TIMP-1, IL-8/TNF- α , TGF- β 1/BMP_{2/4}, IL-22, TGF- β 1 y BMP_{2/4} en platinas con otopresclerosis

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO: transversal, no aleatorio, de cohorte.

DESCRIPCION DEL UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron 11 pacientes de ambos sexos, mayores de 17 años con diagnóstico de otoesclerosis, a quienes se les realizó estapedectomía en el departamento de otorrinolaringología del INER. De la platina que se extrajo por la cirugía de rutina se obtuvo el material que se empleó para el análisis por inmunohistoquímica. Asimismo, de los pacientes sometidos a cirugía, se solicitó una muestra de 10 ml de sangre periférica para la evaluación citométrica de las subpoblaciones de células inflamatorias.

Además, como grupos controles de células mononucleares de sangre periférica, se incluyó la muestra de sangre periférica de 10 voluntarios sanos, con previa realización de audiometría con normoacusia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN PACIENTES CON OTOESCLEROSIS

1. Diagnostico clínico y audiológico de otopatía
2. Sexo indistinto
3. Pacientes quienes durante el procedimiento quirúrgico se les realice otinectomía o hemiotinectomía
4. Aceptación y firma de consentimiento informado para participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Enfermedades autoinmunes, AR, VIH-SIDA u otras inmunodeficiencias, diabetes mellitus, diabetes Tipo I, antecedente de trauma, OMC, OMC con derrame, enfermedad de Paget, osteogénesis imperfecta o alteraciones en el metabolismo óseo o medicamentos que pueden afectar el metabolismo óseo o uso de inmunosupresores o inmunomoduladores, enfermedades inflamatorias sistémicas.
2. Pacientes que sean llevados a otinectomía de revisión.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

1. Otinectomía en donde no se pueda realizar los cortes histológicos por su tamaño.

Estudios:

1. Clasificación quirúrgica microscópica del foco de otopatía según los criterios expuestos anteriormente¹¹
2. Clasificación histológica de otopatía mediante tinción H&E Y PAS

3. Determinación por inmunohistoquímica y doble inmunohistoquímica del porcentaje de células Ki-67/p16^{INK4α}, IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺, CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺, MMP9/TIMP-1, IL-8/TNF- α , TGF- β 1/BMP_{2/4}, IL-22, TGF- β 1 y BMP_{2/4}
4. Audiometría tonal, reflejos estapediales, timpanometría

CONTROLES

Para las muestras de sangre periférica que se analizarán por citometría de flujo se tomarán 10 ml de sangre periférica de individuos sanos

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Individuos sanos pareados por edad y sexo .
2. Pacientes normoacusicos por audiometría
3. Aceptación y firma de consentimiento informado para participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

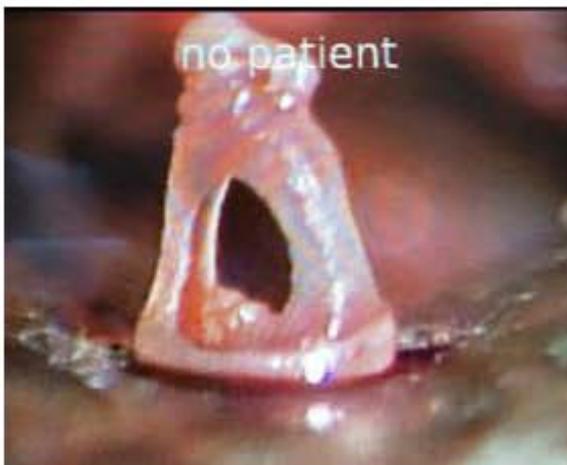
1. Enfermedades autoinmunes, AR, VIH-SIDA u otras inmunodeficiencias, diabetes mellitus, diabetes Tipo I, antecedente de trauma, OMC, OMC con derrame, enfermedad de Paget, osteogénesis imperfecta o alteraciones en el metabolismo óseo o medicamentos que pueden afectar el metabolismo óseo o uso de inmunosupresores o inmunomoduladores, enfermedades inflamatorias sistémicas. Pacientes con hipoacusia en cualquiera de sus presentaciones.

METODOLOGÍA

Técnica Quirúrgica

Bajo sedación se procede a realizar Estapedectomía derecha:

1. Paciente en decúbito supino con Trendelenburg y lateralidad, antisepsia de pabellón auricular, colocación de campos estériles.
2. Se realiza infiltración locorregional de región retroauricular y de CAE en sus 4 cuadrantes con xilocaína 2% + epinefrina 1:100,000, se realiza lavado del conducto.
3. Se realiza incisión horizontal con cuchillo de Rosen a 8 mm anulus timpánico, de las 11 a las 6 pasando con posterior incisión vertical a las 6, se levanta colgajo dermotimpánico hasta llegar al annulus timpánico
4. Abordaje de caja timpánica respetando cuerda del tímpano, se realiza curetaje de pared posterior de CAE para visualizar articulación incudoestapedial, apófisis piramidal, platina y facial timpánico.
5. Se elonga la cuerda del tímpano respetándose, y se corrobora fijación de cadena a nivel de estribo
6. Se realiza estapedotomía, se corta tendón de estribo, se cortan cruras y se desarticula la supraestructura de estribo del yunque, se retira platina.
7. Se coloca prótesis de Causse Fluoroplastic 0.6 x 4.5 x 0.8 mm, colocándolo en proceso lenticular del yunque.
8. Se recoloca colgajo dermotimpánico en su posición
9. Se rellena el CAE con gelfoam



Imágenes 1 a la 6 Técnica Estapedectomía convencional

Descripción macroscópica con Microscopio Carl Zeiss OPMI 1FC con lente de 300X con aumento de 0,4, 06, 1, 1.6y 2,5 y Obtención platina o hemiplatina Otoesclerótica.

- Para la evaluación histológica de la platina se fijó el 50% del material obtenido en formaldehído al 3%, se incluyó en parafina, se realizaron cortes de 4µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina, para su clasificación de acuerdo a los criterios de Iyer V, Gristwood H. (Histopathology of the stapes in otoesclerosis. Pathology 1984)
- Técnica de inmunohistoquímica: A fin de identificar las células que expresan IL-22, TGF-β1 y BMP_{2/4}, se realizaron cortes de tejido embebido en parafina de 4-µm de espesor, los cuales se colocaron en un portaobjetos electrocargados. Las laminillas se desparafinaron durante 45 min a 54°C. El tejido se hidrató con xileno, alcoholes al 100%, 96% y 50%) y agua destilada. Las laminillas se incuban con una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol absoluto (1:9 vol/vol) durante 30 min, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Los tejidos se incubaron durante 18 horas a 4°C con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-22, TGF-β1 o BMP_{2/4} humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) a una concentración de 10 µg/ml. La unión del anticuerpo al antígeno se identificó con un anticuerpo biotinado de burro anti-IgG de cabra (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology). Las laminillas se incubaron con peroxidasa de rábano (HRP)–estreptavidina por 45 min, posteriormente se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (SIGMA-Aldrich) durante 10 min. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron con alcohol y xileno y se montaron en resina. El control negativo se realizó empleando suero humano diluido 1:100, en lugar del anticuerpo primario. El control de reactivos se llevó a cabo sustituyendo el anticuerpo primario con amortiguador fosfato y albúmina de huevo (Sigma-Aldrich). Estos controles excluyen la tinción inespecífica y la actividad de peroxidasa endógena.

Procedimiento de doble tinción de citocinas y proteasas en el tejido

- Para determinar el porcentaje de células Ki-67/p16^{INK4α}, IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IL-IFN-γ⁺, CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺, MMP9/TIMP-1, IL-8/TNF-α y TGF-β1/BMP_{2/4} se llevó a cabo una detección simultánea con un sistema de doble-

tinción (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA). El procedimiento es una tinción secuencial, donde el primer antígeno es visualizado utilizando peroxidasa de rábano (HRP)/3'3'-diaminobencidina (DAB) y el segundo antígeno es revelado utilizando fosfatasa alcalina (AP)/Rojo permanente. Para ello se realizó una incubación de las muestras con 200 μ l de bloqueadores endógenos de enzimas por 5 min. Este procedimiento inhibe la AP endógena, peroxidasa, y la actividad de la pseudoperoxidasa presente en los tejidos. El pegado inespecífico se eliminó incubando los tejidos con el reactivo *IHC background blocker* (Enzo Life Sciences) por 20 min. Posteriormente los tejidos fueron incubados con 200 μ l de un control negativo universal (IHC universal negative control reagent, Enzo Life Sciences) o con los anticuerpos policlonales/monoclonales primarios de ratón Ki-67/p16^{INK4 α} , IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺, CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺, MMP9/TIMP-2, IL-8/TNF- α y TGF- β 1/BMP_{2/4} IgG₁ (Santa Cruz Biotechnology) a 10 μ g/ml por 40 min, a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con 200 μ l de polímero HRP/AP por 20 min. La reacción se visualizó con 200 μ l de DAB durante 5-15 min y posteriormente con 200 μ l de cromógeno Rojo Permanente durante 5-20 min. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y montados en resina acuosa.

- Para determinar el porcentaje de células inmunorreactivas se cuantificaron las células Ki-67/p16^{INK4 α} , IL-22⁺, CD4⁺/IL-17A⁺, CD4⁺/IL-4⁺, CD4⁺/IL-IFN- γ ⁺, CD25⁺/Foxp3⁺, CD20⁺/IL-10⁺, MMP9/TIMP-2, IL-8/TNF- α y TGF- β 1/BMP_{2/4} en el menos dos campos (X320) en dos diferentes secciones de cada biopsia. Los resultados se reportaron como el promedio \pm error estándar y la mediana del porcentaje de células inmunorreactivas empleando el programa Image Pro Plus versión 5 · 1 · 1.

- **Análisis citofluorométrico**

- Un total de 21 pacientes, 10 donadores sanos (HD), 11 pacientes con otosclerosis fueron reclutados para el estudio. Para realizar la inmunofenotipificación de las células circulantes, se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica (20 mL) de cada paciente e individuo sano y de ésta se aislaron las células mononucleares (CMNs) a través de un gradiente de densidad [Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)].

- Para determinar el porcentaje de células Th22 (CD3⁺/CD4⁺/CD161⁻/IL-22⁺), Th17 (CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-17A⁺), Th2 (CD14⁻/CD3⁺/CD4⁺/IL-4⁺), Th1 (CD14⁻/CD3⁺/CD4⁺/IFN- γ ⁺), de células T reguladoras (CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺), de Bregs (CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺) y pDCs (CD123^{hi}/CD196⁺/IDO⁺) las CMNs fueron incubadas con 5 μ L de anticuerpo monoclonal anti-CD3-FITC, anti-CD4-PeCy5 y anti-CD161-APC (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-CD3-FITC, anti-CD4-PeCy5 y anti-CD14-APC (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-CD19-APC, anti-CD38-PeCy5, anti-CD24-FITC o anti-CD123-FITC, anti-CCR6-PeCy5 en tubos separados durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células fueron permeabilizadas con 200 μ L de solución cytofix/cytoperm (BD Biosciences) a 4°C por 90 min. La tinción intracelular se llevó a cabo mediante la incubación con 5 μ L de un anticuerpo anti-IL-22-PE, anti-IL-17A-PE, anti-IL-4-PE, anti-IFN- γ -PE, anti-Foxp3-PE anti-IL-10-PE o anti-IDO-PE (BD Biosciences) durante 45 min a 4°C y en oscuridad. Finalmente, un total de 500,000–1,000,000 de eventos fueron adquiridos de cada muestra en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FlowJo X software (Tree Star, Inc.).
 - Para el análisis de las muestras adquiridas se trazó una ventana electrónica para las células CD3⁺/CD4⁺/CD161⁻, CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺, CD3⁺/CD4⁺/CD14⁻, CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}, CD19⁺/CD38^{hi}/CD24^{hi} o CD123^{hi}/CCR6⁺. Los resultados se expresaron como el porcentaje relativo de las células IL-22⁺, IL-17A⁺, IL-4⁺, IFN- γ ⁺, Foxp3⁺, IL-10⁺ o IDO⁺ en cada ventana electrónica. (Gráfica 2).
 - Como control de isotipo se empleó una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón de tipo IgG₁k-FITC/IgG₁-PE/CD45-PeCy5 (BD Tritest™, BD Biosciences). Además se realizó un control de autofluorescencia y los respectivos controles FMO (fluorescence minus one).

TAMAÑO DE MUESTRA

Con base en un estudio previo (Richard C, et al., Identification of target proteins involved in cochlear otoesclerosis. *Oto Neurotol*, 2015;36(5):923-31) en el que se determinó que un 60% de los pacientes presentaban abundantes células productoras de TGF- β 1 con respecto a ningún control normal de hueso temporal, se espera un valor de Δ mínimo del 60%. Para **observar estas diferencias considerando un valor α de 0.05 y un valor de $1-\beta$ de 0.80** se utilizó la fórmula para comparar 2 proporciones de dos colas:

$$N = \frac{[\sqrt{\{pq(1+1/k)\}} z_{1-\alpha/2} + \sqrt{\{p_1q_1+p_2q_2/k\}} z_{1-\beta}]^2}{\Delta^2}$$

Por lo tanto se requieren de estudiar al menos 6 pacientes.

TABLA 1. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO Y SUS ESCALAS DE MEDICIÓN

Variables Independientes

EDAD	Numérica, discreta										
SEXO	Dicotómica										
TIEMPO DE EVOLUCIÓN	Numérica discreta										
ENFERMEDAD UNI O BILATERAL	Dicotómica										
OIDO OPERADO	Dicotómica										
CLASIFICACIÓN QUIRÚRGICA DEL FOCO DE OTOESCLEROSIS: CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS BAJO VISION MICROSCÓPICA ¹¹	Ordinal <table border="1"> <tr> <td>Grado I</td> <td>Otoesclerosis azul</td> </tr> <tr> <td>Grado II</td> <td>Otoesclerosis Blanca</td> </tr> <tr> <td>Grado III</td> <td>Otoesclerosis Obliterativa</td> </tr> </table>	Grado I	Otoesclerosis azul	Grado II	Otoesclerosis Blanca	Grado III	Otoesclerosis Obliterativa				
Grado I	Otoesclerosis azul										
Grado II	Otoesclerosis Blanca										
Grado III	Otoesclerosis Obliterativa										
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	Ordinal Cuatro grados <table border="1"> <tr> <td>Grado O</td> <td>Platina normal</td> </tr> <tr> <td>Grado I</td> <td>Calcificación ósea aumentada</td> </tr> <tr> <td>Grado II</td> <td>Remodelación leve</td> </tr> <tr> <td>Grado III</td> <td>Remodelación moderada</td> </tr> <tr> <td>Grado IV</td> <td>Remodelación severa</td> </tr> </table>	Grado O	Platina normal	Grado I	Calcificación ósea aumentada	Grado II	Remodelación leve	Grado III	Remodelación moderada	Grado IV	Remodelación severa
Grado O	Platina normal										
Grado I	Calcificación ósea aumentada										
Grado II	Remodelación leve										
Grado III	Remodelación moderada										
Grado IV	Remodelación severa										
GRADO DE HIPOACUSIA (previo a PTA (en frecuencias de 500, 1000 y 2000Hz)	Ordinal <table border="1"> <tr> <td>NORMAL</td> <td>PTA >20 dB</td> </tr> <tr> <td>SUPERFICIAL</td> <td>PTA 21 A 40 dB</td> </tr> <tr> <td>MEDIA</td> <td>PTA 41-60dB</td> </tr> <tr> <td>PROFUNDA</td> <td>PTA 61-80 dB</td> </tr> <tr> <td>SEVERA</td> <td>PTA <80 dB</td> </tr> </table>	NORMAL	PTA >20 dB	SUPERFICIAL	PTA 21 A 40 dB	MEDIA	PTA 41-60dB	PROFUNDA	PTA 61-80 dB	SEVERA	PTA <80 dB
NORMAL	PTA >20 dB										
SUPERFICIAL	PTA 21 A 40 dB										
MEDIA	PTA 41-60dB										
PROFUNDA	PTA 61-80 dB										
SEVERA	PTA <80 dB										
BRECHA (en frecuencias de 500, 1000 y 2000Hz)	Numérica discreta										
Timpanometría	Nominal Tipo A, As, C, B										

Variables dependientes

Presencia de Ki-67/p16 ^{INK4α} , IL-22 ⁺ , CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ , CD4 ⁺ /IL-4 ⁺ , CD4 ⁺ /IL-IFN- γ ⁺ , CD25 ⁺ /Foxp3 ⁺ , CD20 ⁺ /IL-10 ⁺ , MMP9/MMP2, IL-8/TNF- α , TGF- β 1/BMP _{2/4} , IL-22, TGF- β 1 y BMP _{2/4} CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD161 ⁻ , CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD161 ⁺ , CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD14 ⁻ , CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ^{hi} , CD19 ⁺ /CD38 ^{hi} /CD24 ^{hi} o CD123 ^{hi} /CCR6	Numéricas discretas
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva, las variables categóricas se compararon mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher. Se realizó un análisis de varianza por ANOVA de una vía mediante el subanálisis de Holm-Sidak y prueba de Dunn para todos los procedimientos de comparación múltiple pareada. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Sigma Stat 11.2 (Aspire Software International, Leesburg, VA, EE.UU.). Los datos se expresan como la mediana, el intervalo y el promedio \pm desviación estándar (SD) / Error estándar de la media (SEM). Los valores de P menores o iguales a 0,05 fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

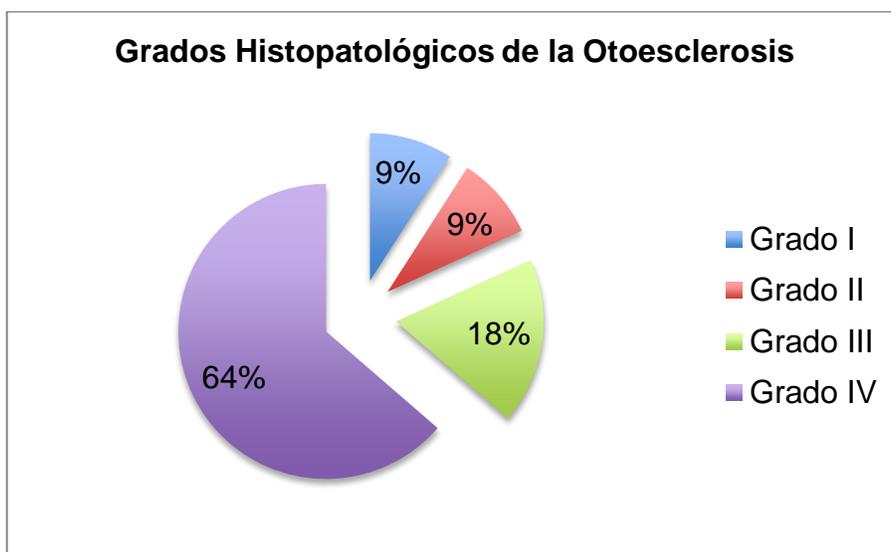
Se reclutaron un total de 11 pacientes con otoposclerosis y 10 donadores sanos y normoacúscicos. De los pacientes con otoposclerosis 8 fueron mujeres (73%) y 3 hombres (27%), con un promedio de edad de 46 años, la mediana con respecto del inicio de los síntomas fue de cuatro años, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con otoposclerosis

	Controles Sanos (n=10)	Pacientes Con Otoposclerosis (n=11)	P
Datos Demográficos			
Edad, (años)			
promedio± DS	42.9 ± 18.5	42.3 ± 10.4	ns
Mediana	52.0	46.0	
Intervalo	23 — 62	27 — 56	
Sexo (Femenino %)	80	72	ns
Duración de la enfermedad, (años)			
promedio± DS		6.8 ± 1.9	
Mediana		4.0	
Intervalo		2.0 — 20.0	
Variables de Laboratorio			
Leucocitos, (céls/ml)			
promedio± DS	6.8 X 10 ⁹ ± 1.4 X 10 ⁹	7.6 X 10 ⁹ ± 1.4 X 10 ⁹	
Mediana	7.2	7.4	
Intervalo	5.2 — 7.9	5.1 — 10.2	
Linfocitos (%)			
promedio± DS	28.8 ± 2.6	32.1 ± 8.5	<0.001
Mediana	27.5	33.1	
Intervalo	27.00 — 31.8	18.9 — 46.5	
Monocitos (%)			
promedio± DS	6.1 ± 1.9	8.1 ± 1.7	<0.001
Mediana	5.5	7.9	
Intervalo	4.5 — 8.2	6.2 — 10.6	

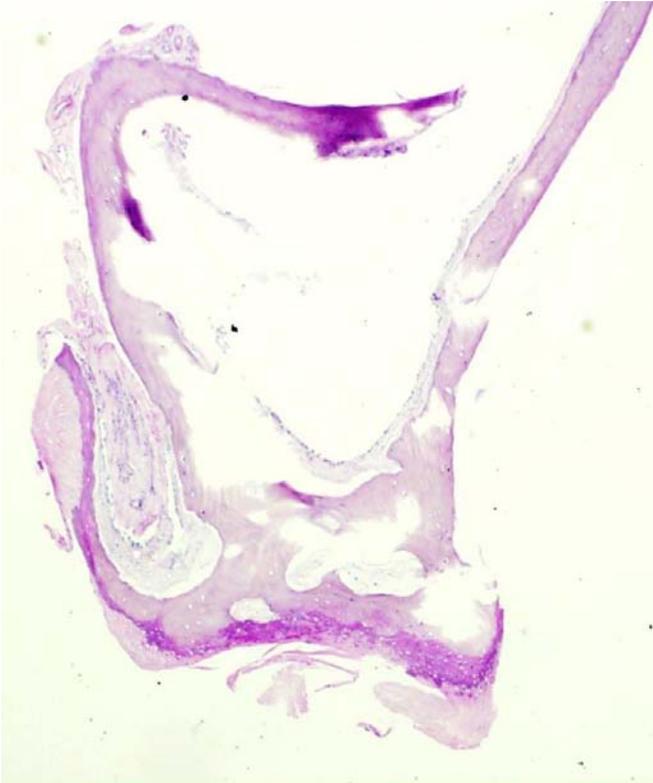
Hallazgos macroscópicos e histopatológicos de las Platinas.

Posterior a la extracción de la platina o hemiplatina ésta se fijó en formaldehído al 3% y se incluyó en parafina, se obtuvieron con cortes de 4µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su clasificación en los cuatro grados histológicos. La distribución de los hallazgos anatómo-patológicos mostró preponderancia de platinas (Grado IV) en el 64% de las muestras analizadas seguidas del grado III en el 18% y del grado I y II en el 9% de los casos, respectivamente (Gráfica 1).

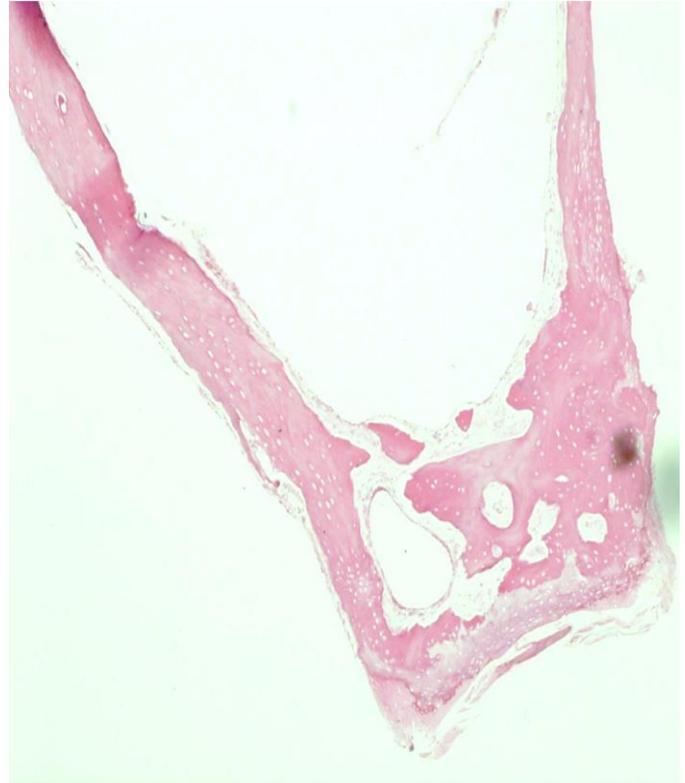


Gráfica 3. Grados Histopatológicos de la otoesclerosis

Histológicamente se determinó la presencia de algunas células mononucleares, reabsorciones circulares óseas alrededor de los vasos (lagunas vasculares) y un aumento local de la microcirculación mostrando un hueso esponjoso claramente diferenciado del hueso lamelar normal. En algunos casos también se observaron depósitos óseos en estas áreas de reabsorción y estrechamiento de los canales vasculares (Imágenes 7 y 8).



Imágenes 7 Tinción PAS

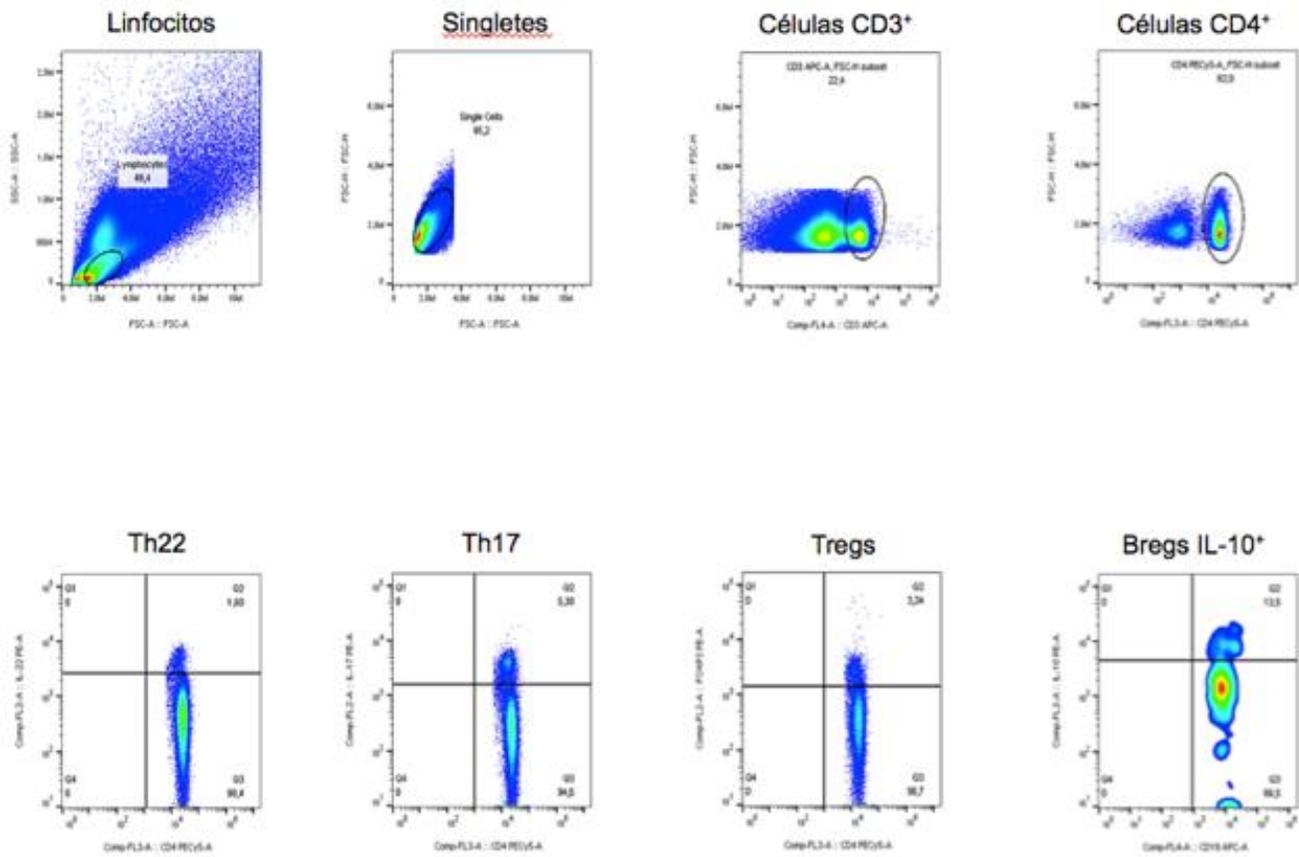


Imágenes 8 Tinción H&E

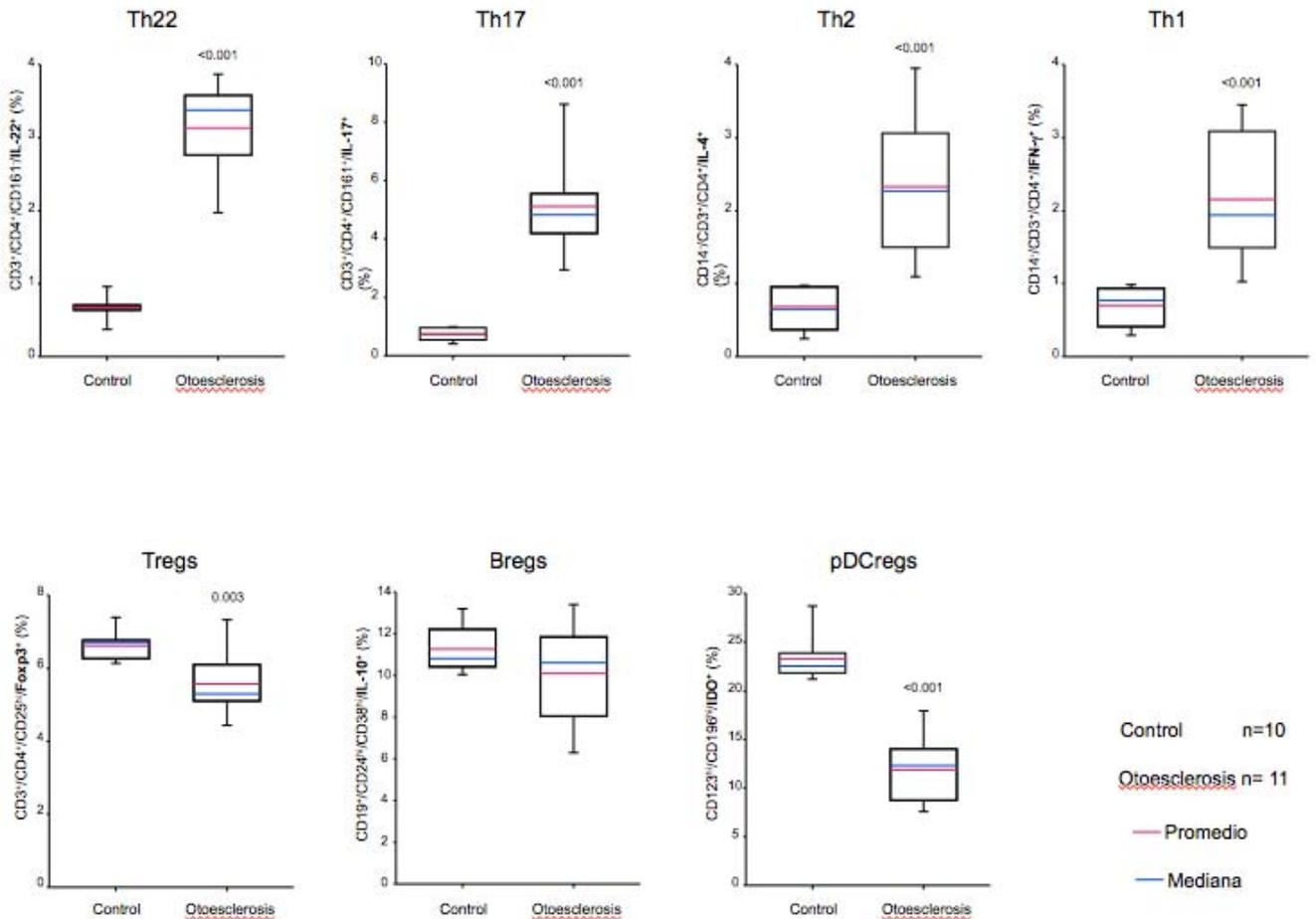
Porcentaje de las subpoblaciones de células T CD4⁺, Bregs and pDCregs circulantes

Las muestras de sangre venosa periférica de pacientes con otoesclerosis y controles fueron inmunofenotipificadas. La evaluación por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de células T mostró que las células Th22, Th17, Th2 y Th1 de sangre periférica de los pacientes con otoesclerosis se encontraban aumentadas en comparación con el grupo control de individuos sanos (Gráficas 2, 3 y Tabla 3).

Las células Tregs y las pDCregs presentaron una disminución estadísticamente significativa en los pacientes con otoesclerosis vs. los controles, (Gráficas 2, 3 y Tabla 3).



Gráfica 2 Immunofenotipificación de las células circulantes



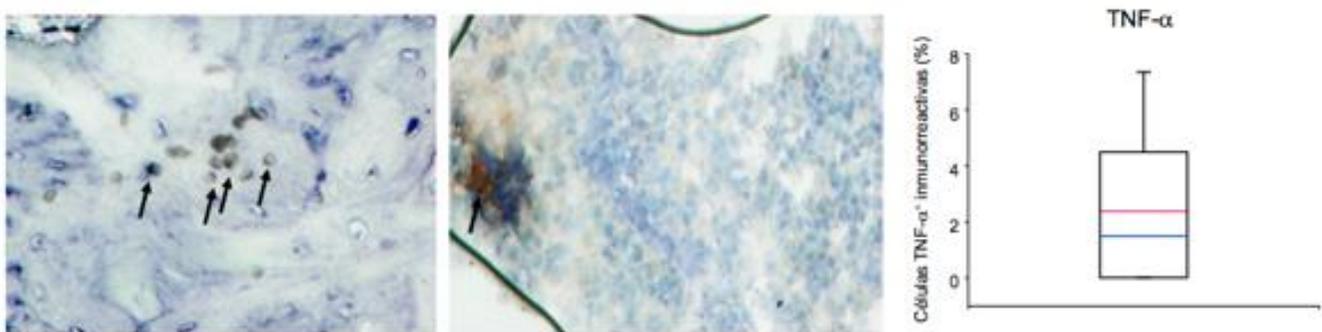
Gráfica 3 Comparación de la expresión de citocinas y presencia de células reguladoras en pacientes con otoesclerosis y pacientes sanos controles

Tabla 3. Expresión de citocinas y presencia de células reguladoras en las Células Mononucleares de Sangre Periférica.

	Controles	Pacientes	P
	Sanos	Con Otoesclerosis	
	(n=10)	(n=11)	
CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-22⁺ (%)			
Promedio ± ES	0.67 ± 0.5	3.3 ± 0.1	<0.001
Mediana	0.68	3.4	
Intervalo	0.11	0.3	
CD3⁺/CD4⁺/CD161⁺/IL-17A⁺ (%)			
Promedio ± ES	0.73 ± 0.8	5.2 ± 0.6	<0.001
Mediana	0.73	5	
Intervalo	0.17	1.2	
CD3⁺/CD4⁺/CD14⁺/IL-4⁺ (%)			
Promedio ± ES	0.66 ± 0.9	2.5 ± 0.3	<0.001
Mediana	0.65	2.5	
Intervalo	0.21	0.7	
CD3⁺/CD4⁺/CD14⁺/IFN-γ⁺ (%)			
Promedio ± ES	0.70 ± 0.8	2.4 ± 0.2	<0.001
Mediana	0.77	2	
Intervalo	0.18	0.5	
CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}/Foxp3⁺ (%)			
Promedio ± ES	6.61 ± 0.13	5.5 ± 0.2	0.003
Mediana	6.72	5.3	
Intervalo	0.29	0.5	
CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺ (%)			
Promedio ± ES	11.27 ± 0.36	10.2 ± 0.7	ns
Mediana	10.80	11	
Intervalo	0.82	1.6	
CD123^{hi}/CD196^{hi}/IDO⁺ (%)			
Promedio ± ES	23.27 ± 0.77	10.9 ± 0.9	<0.001
Mediana	22.5	10.5	
Intervalo	1.75	2	

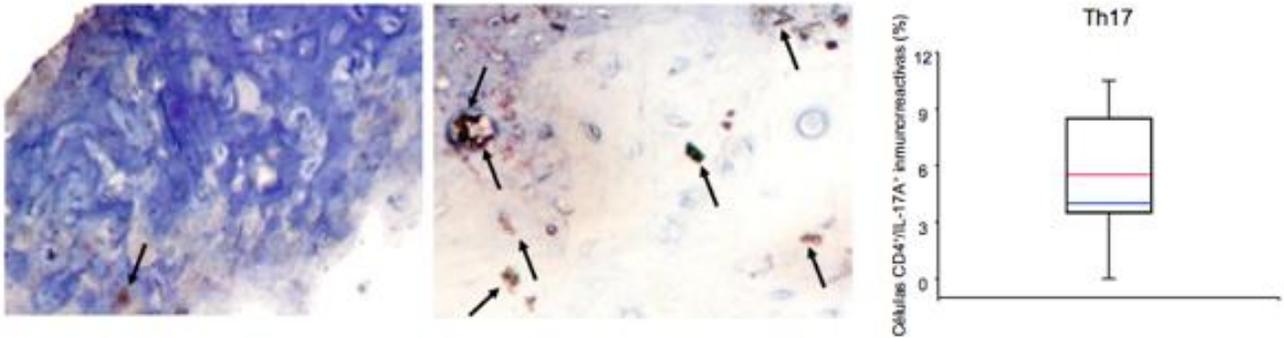
Expresión de citocinas pro-inflamatorias/anti-fibrogénicas en la platina de los pacientes con otoesclerosis

El factor de necrosis $\text{TNF-}\alpha$ es una hormona polipeptídica producida por monocitos/macrófagos activados. Esta citocina modula una serie de procesos biológicos, como la mediación de la defensa del huésped contra el crecimiento de células neoplásicas y el incremento en la expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. También se le ha implicado en el desarrollo de caquexia en estados de choque por vasodilatación marcada, sostenida y resistente a vasopresores (debido al aumento en la producción de óxido nítrico, al estimular el incremento en la expresión de la forma inducible de la sintetasa de óxido nítrico) y es, además, una molécula efectora en varios procesos inflamatorios. La expresión de esta citocina en las células de la platina de los pacientes con otoesclerosis fue menor al 3% (Imágenes 9 y 10, Gráfica 4, Tabla 4).



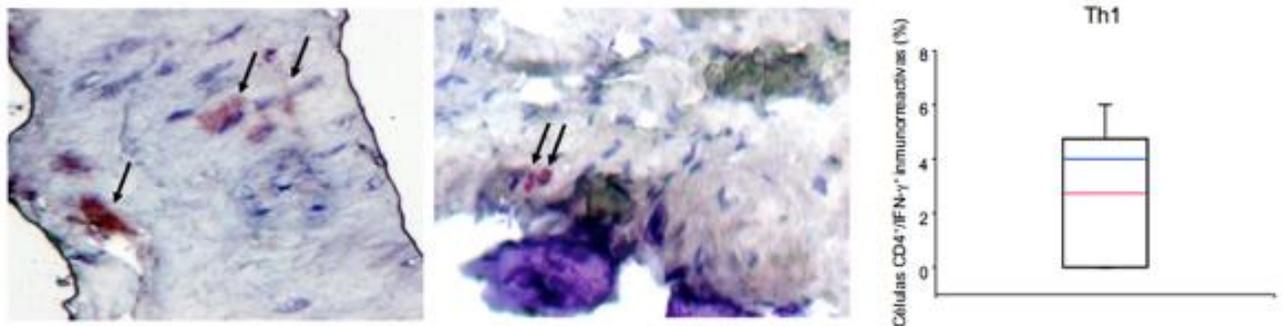
Imágenes 9 y 10. Gráfica 4. Citocinas pro-inflamatorias $\text{TNF-}\alpha$

La interleucina 17A (IL-17A) se descubrió en 1993, y es el miembro prototipo de la subclase más nueva de citocinas. Se ha reconocido como una citocina inflamatoria que ejerce su función principalmente sobre células mieloides y células mesenquimales al inducir la expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), de la IL-6 y de otras quimiocinas, las cuales incrementan la granulopoyesis y reclutan neutrófilos hacia el sitio de infección. El nivel de células productoras de IL-17A fue mayor al 5% en el grupo de pacientes con otoesclerosis. (Imágenes 10 y 11, Gráfica 5, Tabla4).



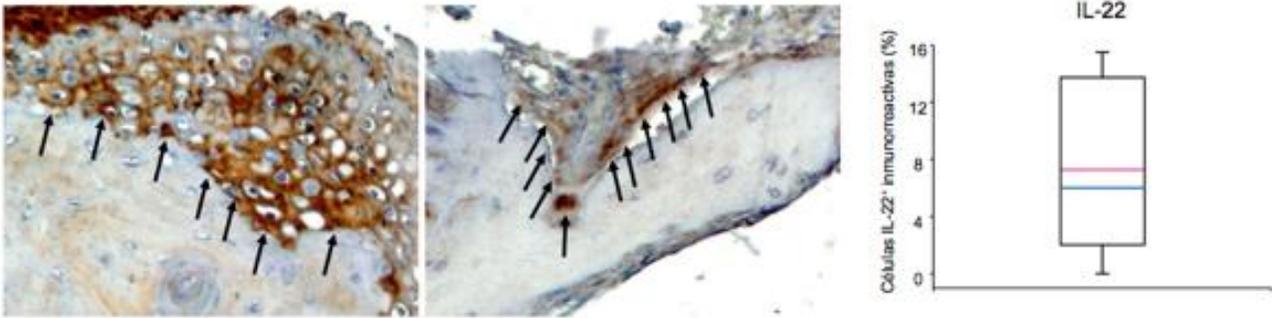
Imágenes 10 y 11. Gráfica 5. Subpoblaciones de Células T CD4⁺ Th17

El IFN- γ o interferón de tipo II, es una citocina que es crítica para la inmunidad innata y adaptativa frente a las infecciones bacterianas y virales intracelulares y para el control del crecimiento tumoral. El IFN- γ es un importante activador de los macrófagos. Los pacientes con otesclerosis presentaron un porcentaje considerable de linfocitos productores de IFN- γ (Imágenes 12 y 13, Gráfica 6, Tabla4).



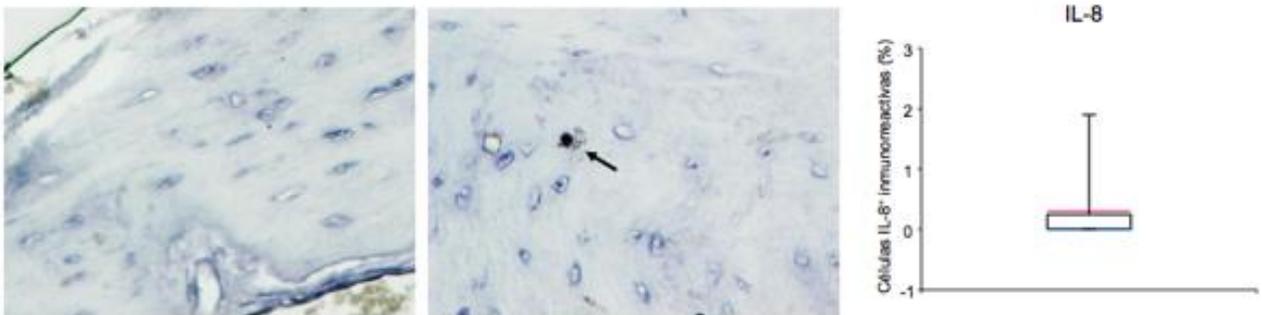
Imágenes 12 y 13. Gráfica 6. Subpoblaciones de Células T CD4⁺ Th1

La IL-22 pertenece a la superfamilia de la IL-10, inicia la respuesta inmune innata contra bacterias patogénicas del tracto digestivo y respiratorio. Esta interleucina se encontró abundantemente expresada en las muestras de tejido de los pacientes con otesclerosis (Imágenes 14 y 15. Gráfica 7, Tabla 4).



Imágenes 14 y 15. Gráfica 7. Citocinas pro-inflamatorias IL-22

La IL-8 pertenece a la familia de las quimiocinas CXC ERL. Su función principal es la atracción de neutrófilos y se produce en monocitos, linfocitos T, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y neutrófilos. Su función específica es atraer neutrófilos que se fijan al endotelio para el inicio de la diapedesis. Además puede atraer linfocitos T, queratinocitos, basófilos, y posee actividad angiogénica. La expresión de la IL-8 en la platina de los pacientes con otoesclerosis fue prácticamente nula (Imágenes 16 y 17, Gráfica 8, Tabla4).



Imágenes 16 y 17. Gráfica 8. Citocinas pro-inflamatorias IL-8

Expresión de citocinas anti-inflamatorias/pro-fibrogénicas

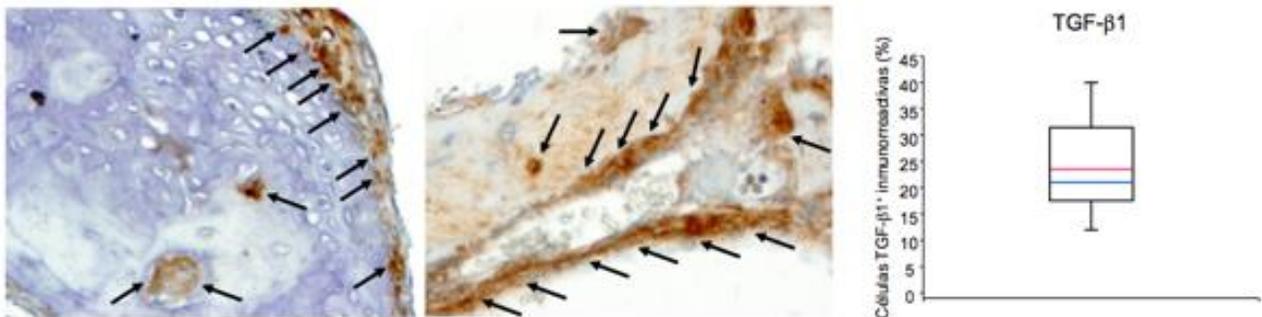
La IL-4 es una citocina anti-inflamatoria que inhibe la síntesis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17A, etc. Participa en la regulación de la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis. Es sintetizada principalmente por las células Th2. Los

pacientes con otopresclerosis presentaron un número no mayor al 3% en los vasos sanguíneos (Imágenes 18 y 19, Gráfica 9, Tabla 4)



Imágenes 18 y 19. Gráfica 9. Subpoblaciones de Células T CD4⁺ Th2

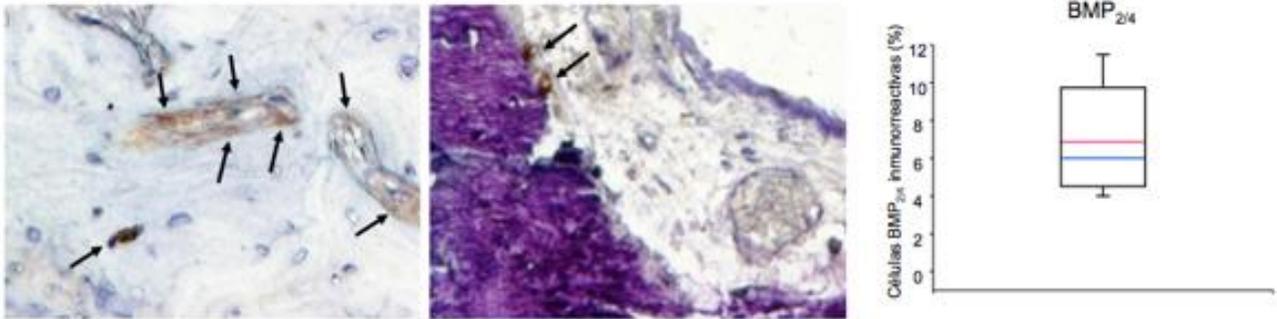
El TGF-β1 lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación, diferenciación, regulación negativa de la inflamación, producción de colágena y apoptosis. En el tejido de los pacientes con otopresclerosis se determinó una abundante expresión de este factor de crecimiento a nivel perivascular (Imágenes 20 y 21, Gráfica 10, Tabla 4).



Imágenes 20 y 21. Gráfica 10. Citocinas Reguladoras de la Síntesis de Matriz extracelular TGF-β1

Las proteína morfogenética del hueso BMP_{2/4} es un factor de crecimiento que pertenece a la familia del TGF-β, tiene la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo, cartílago y tejido conjuntivo. El BMP_{2/4} se encuentra predominantemente expresado en los vasos

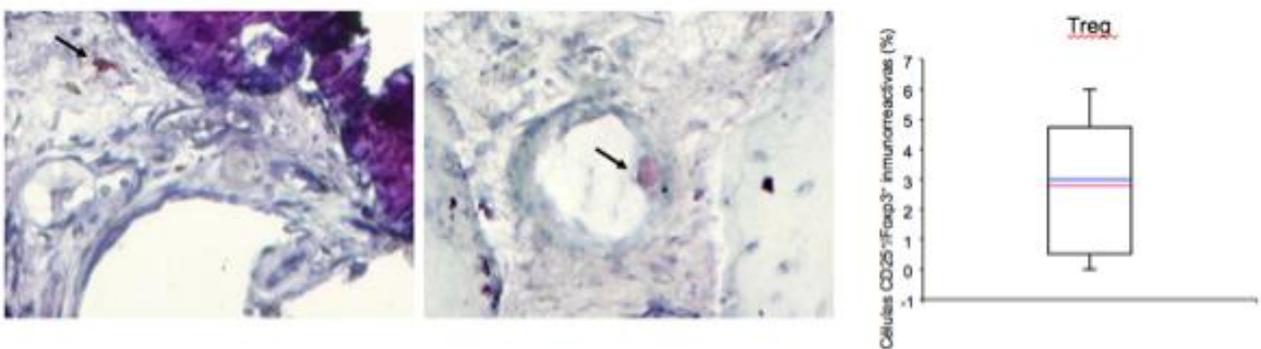
sanguíneos de las platinas de los pacientes con otopresclerosis (Imágenes 22 y 23, Gráfica 11, Tabla 4).



Imágenes 22 y 23. Gráfica 11. Citocinas Regulatoras de la Síntesis de Matriz extracelular BMP_{2/4}

Células Regulatoras

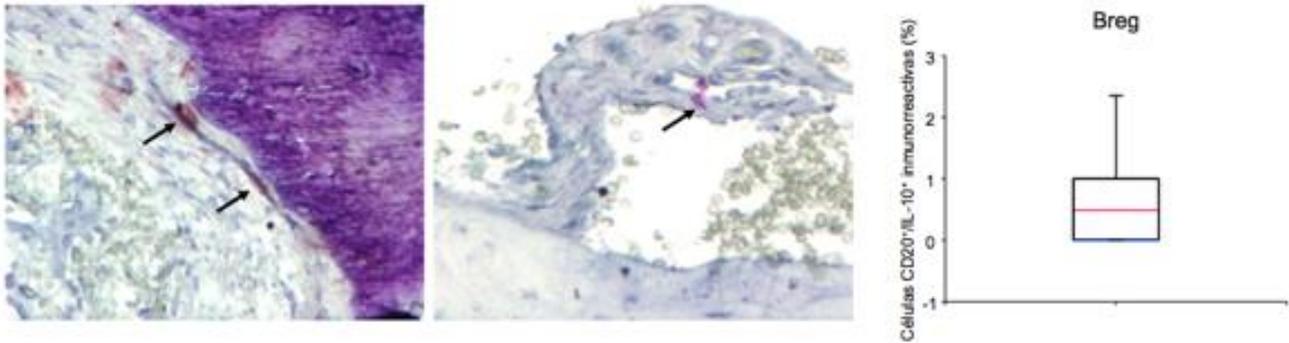
Las células Tregs son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa suprimiendo la activación de las células T efectoras, manteniendo así la homeostasis y favoreciendo la tolerancia hacia los autoantígenos. Los pacientes con otopresclerosis presentaron un número de Tregs menor al 3% (Imágenes 24 y 25, Gráfica 12, Tabla 4).



Imágenes 24 y 25. Gráfica 12. Subpoblaciones de Células Regulatoras Treg

Durante los últimos años se ha demostrado en humanos la existencia de células B con capacidad reguladora (Breg). Esta función se ha adjudicado a la capacidad de producir IL-10

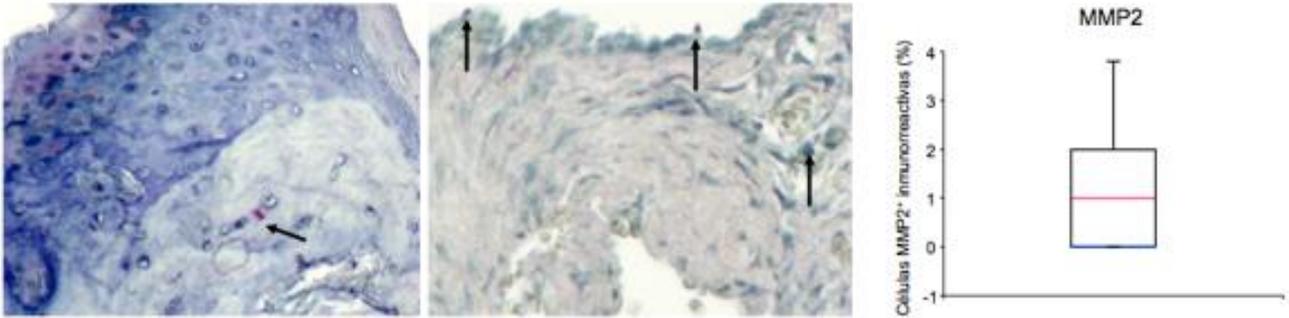
y de reducir la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-17 por las células T CD4⁺. Además, las células Breg promueven la diferenciación de linfocitos T a un fenotipo regulador e inducen la remisión de manifestaciones autoinmunes en diferentes modelos murinos. Las biopsias de los pacientes con otoposclerosis presentaron un porcentaje relativo de células B productoras de IL-10 menor al 1% (Imágenes 26 y 27, Gráfica 13, Tabla 4)



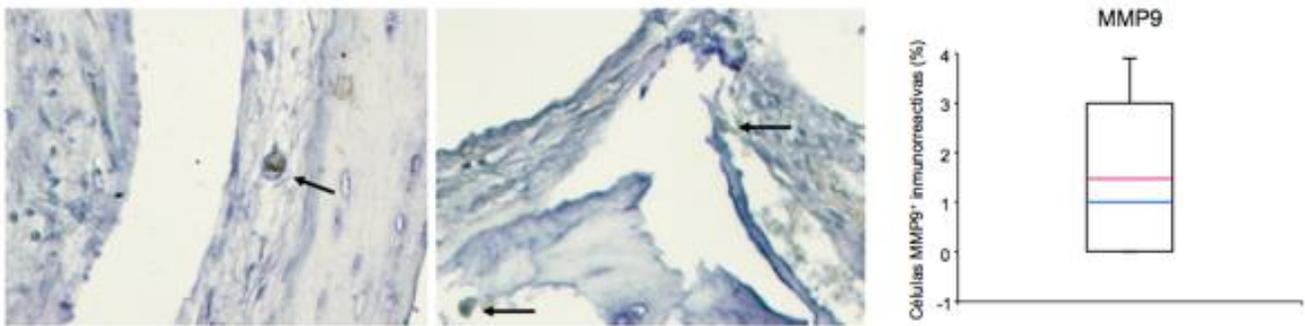
Imágenes 26 y 27. Gráfica 13. Subpoblaciones de Células Regulatoras Breg

Proteínas involucradas en el recambio de la matriz extracelular en los pacientes con otoposclerosis

La MMP-9 o gelatinasa de 92 kD y la MMP2 o gelatinasa de 72KD participan en la degradación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la reproducción, la angiogénesis, el desarrollo óseo, la cicatrización de heridas, la migración celular, etc., y en procesos patológicos que incluyen el desarrollo de tumores malignos, toda vez que degrada a la colágena tipo IV de la membrana basal facilitando la metástasis tumoral y la angiogénesis. El tejido de los pacientes con otoposclerosis presentó un número de células inmunorreactivas en el parénquima menor al 2% (Imágenes 28-31 y Gráficas 14,15, Tabla 4).



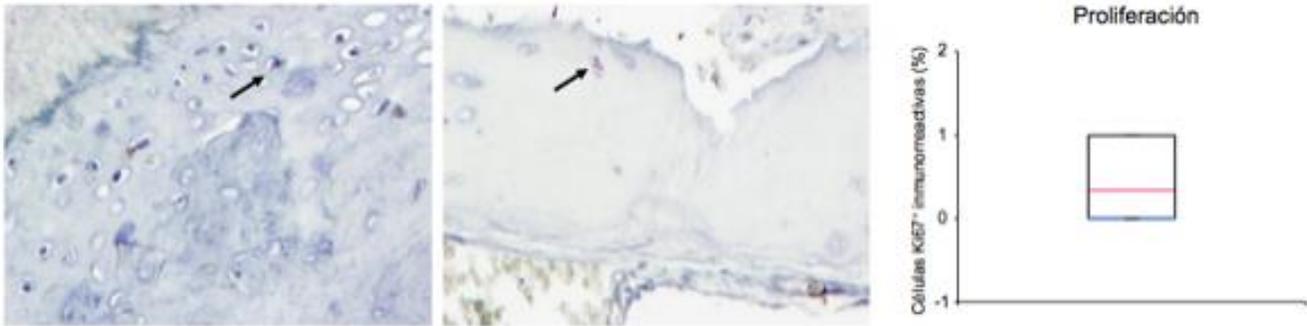
Imágenes 28 y 29. Gráfico 14. Proteasas que participan en el recambio de Matriz extracelular MMP2



Imágenes 30 y 31. Gráfica 15. Proteasas que participan en el recambio de Matriz extracelular MMP9

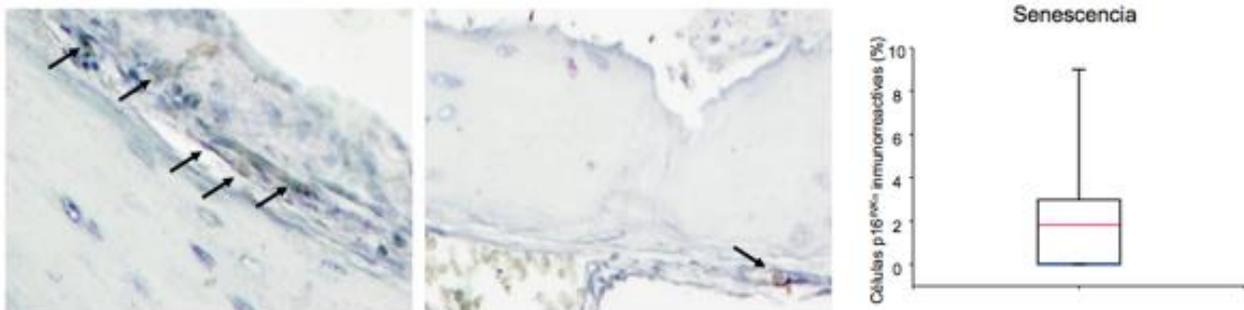
Proliferación y senescencia en la platina de los pacientes con otoesclerosis

La proliferación y diferenciación celular son esenciales para la formación, reparación y mantenimiento de la adecuada funcionalidad de todos los tejidos y órganos en el organismo. Cuando un tejido en desarrollo alcanza un cierto tamaño y organización, sus células dejan progresivamente de proliferar y diferencian. El retorno al estado proliferativo se produce cuando el tejido debe regenerarse pero al diferenciarse, ciertas células pierden irreversiblemente la capacidad de división. Desequilibrios de este control conducen a trastornos de proliferación y junto a ciertas mutaciones convierten genes reguladores de proliferación y diferenciación en oncogenes desencadenantes de cáncer. La proliferación de las células de la platina de los pacientes con otoesclerosis fue prácticamente nula (Imágenes 32 y 33, Gráfica 16, Tabla 4).



Imágenes 32 y 33. Gráfica 16. Proliferación

La senescencia celular se refiere a la respuesta de las células, mitóticamente competentes (células no diferenciadas terminalmente y que por lo tanto tienen la capacidad de dividirse) frente a estímulos que tienen la potencialidad de causar transformaciones neoplásicas y está dada entre otros aspectos, en un arresto de su crecimiento. Las platinas de los pacientes con otopresclerosis presentaron un número de células senescentes menor al 2% (Imágenes 34 y 35, Gráfica 17, Tabla 4).



Imágenes 34 y 35. Gráfica 17. Senescencia

Tabla 4. Expresión de citocinas y presencia de células reguladoras en la platina de los pacientes con Otoesclerosis.

Otoesclerosis	
(n=11)	
Células productoras de IL-22 (%)	
Promedio ± ES	6.9 ± 1,8
Mediana	5.0
Intervalo	0 — 15.5
Células CD4⁺ productoras de IL-17A (%)	
Promedio ± ES	5.6 ± 0.9
Mediana	4.5
Intervalo	0 — 10.5
Células CD4⁺ productoras de IL-4 (%)	
Promedio ± ES	2.2 ± 0.8
Mediana	1.0
Intervalo	0 — 8.0
Células CD4⁺ productoras de IFN-γ (%)	
Promedio ± ES	3.2 ± 0.85
Mediana	4.0
Intervalo	0 — 7.0
Células CD25⁺ que expresan Foxp3 (%)	
Promedio ± ES	2.8 ± 0.7
Mediana	3.0
Intervalo	0 — 6.0
Células CD20⁺ productoras de IL-10 (%)	
Promedio ± ES	0.5 ± 0.3
Mediana	0
Intervalo	0 — 2.5
Células productoras de IL-8 (%)	
Promedio ± ES	0.3 ± 0.2
Mediana	0
Intervalo	0 — 2.0

Células TNF-a (%)

Promedio ± ES	2.3 ± 0.9
Mediana	1.5
Intervalo	0 — 7.5

Células TGF-b1 (%)

Promedio ± ES	23.7 ± 3.2
Mediana	21.0
Intervalo	12.0 — 40.0

Células BMP2/4 (%)

Promedio ± ES	6.83 ± 0.95
Mediana	6
Intervalo	4.0 — 11.5

Células MMP2

Promedio ± ES	1.0 ± 0.5
Mediana	0
Intervalo	0 — 4.0

Células MMP9 (%)

Promedio ± ES	1.5 ± 0.5
Mediana	1
Intervalo	0 — 4.0

Células Ki 67 (%)

Promedio ± ES	0.3 ± 0.2
Mediana	0
Intervalo	0 — 1.0

Células p16 (%)

Promedio ± ES	1.8 ± 1.1
Mediana	0
Intervalo	0 — 9.0

DISCUSIÓN

Una de las múltiples teorías de la otoesclerosis es la inflamatoria debido a la persistencia del virus del sarampión en la cápsula ótica; se encontró la secuencia del RNA del virus del sarampión en todas las platinas analizadas con diagnóstico histopatológico de otoesclerosis según Szikíai et al 2008, a diferencia de las platinas sin otoesclerosis donde estaba ausente; la presencia del virus del sarampión se asoció significativamente a la presencia del $TNF\gamma$ que nos sugiere un proceso inflamatorio activo, con la activación osteoclástica siendo un desencadenante de la reabsorción ósea.

Otros efectos a largo plazo encontrados por la presencia del $TNF\gamma$ son la hipoacusia sensorineural, se requieren de estudios posteriores para corroborar su asociación. En nuestro estudio encontramos la presencia $TNF\gamma$ en el 60% de las platinas estudiadas.

La inhibición $TNF\gamma$ se podría considerar como un tratamiento alternativo en la otoesclerosis coclear en donde el tratamiento quirúrgico está contraindicado [2, 12, 18]

Un papel importante es el desempeñado por los genes involucrados en la otoesclerosis asociados a un metabolismo del hueso anormal como son COL1A1, TGFB1, BMP2 y BMP4; se encontró la asociación del polimorfismo T2631 con TGFB1 en un estudio realizado en la población de Túnez (Khalfallah et al., 2011) y se ha demostrado la presencia del TGFB1 en focos otoescleróticos (Richard et al, 2015). El TGFB1 es una citocina multifuncional esencial para el mantenimiento de la homeostasis del hueso y de la respuesta inmune, regula la matriz ósea en huesos largos y se ha encontrado su asociación a pacientes con otoesclerosis en poblaciones Holandesas y Francesas. [19, 20, 21, 22]. En nuestro estudio se observó la presencia de esta citosina en el 100% de las platinas estudiadas con gran proporción una mediana de 23.7 ± 3.2 , confirmando su importancia en la patogenia de la enfermedad, se ha propuesto como el factor de mayor importancia en el desarrollo y progresión de la otoesclerosis. [22].

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la participación de las células Th22 las cuales conforman una subpoblación de células $CD4^+$ T cooperadoras que se diferencian a partir de células T vírgenes en respuesta a $TNF-\alpha$ e IL-6, y se caracterizan por la secreción de IL-22 pero no de IL-17 o $IFN-\gamma$. Las células Th22 también producen IL-26 e IL-13 además de IL-22. La IL-22 es la citocina funcional más relevante y su papel es importante en la

proliferación y supervivencia celular así como en la producción de péptidos antibacterianos, por lo que participa en la inmunidad y la remodelación de los epitelios. La expresión anormal de las células Th22 se ha observado en sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunes como psoriasis, esclerosis sistémica y artritis reumatoide. Hasta el momento se considera que su participación en diferentes tejidos es paradójica, ya que puede tener un comportamiento inflamatorio o antiinflamatorio.

La presencia de las células Th22 en los pacientes con otoesclerosis no había sido previamente determinada. En el presente estudio se determinó su presencia tanto en células circulantes como en el tejido.

Otra de las poblaciones celulares que estudiamos fue la Th17. Dicha población celular produce IL-17A que desempeña un papel pro-inflamatorio en enfermedades autoinmunes a través de la regulación de quimiocinas y el reclutamiento de neutrófilos. En la platina de los pacientes con otoesclerosis las células Th17 se encontraron a nivel perivascular y parenquimatoso.

El IFN- γ está involucrado en la inmunidad mediada por células y activación de macrófagos, defensa del huésped a patógenos intracelulares, respuesta celular de tipo Th1. En paralelo, el IFN- γ ejerce funciones reguladoras para limitar el daño tisular asociado a la inflamación, modula a las células T cooperadoras y la diferenciación de células T reguladoras (Tregs). Puede aumentar o suprimir la autoinmunidad y la patología asociada en un contexto o enfermedad de manera específica. Esta citocina es producida por las células NK durante la respuesta inmune temprana, y por células Th1 activadas durante la respuesta inmune adaptativa. En el presente trabajo evidenciamos la expresión de IFN- γ en tejido y a nivel periférico en los pacientes con otoesclerosis. Aunque este hallazgo es de menor magnitud que la respuesta Th17 previamente descrita.

Por otra parte, la respuesta mediada por células Th2 se encuentra definida por la producción de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, la cual puede ser patogénica o protectora. La inmunidad tipo 2 promueve la respuesta contra helmintos, suprime la enfermedad autoinmune mediada por células Th1, neutraliza las toxinas, mantiene la homeostasis metabólica, pero sobre todo

regula la cicatrización, la regeneración tisular y la fibrosis. En cuanto a la respuesta Th2 mediada por IL-4 documentamos una expresión menor al 3%.

En relación a las células con un papel regulatorio, se evaluaron a las Tregs, un subtipo de linfocitos T CD4⁺ que tiene un papel crucial en el control de las enfermedades inflamatorias y las autoinmunes así como en el mantenimiento de la homeostasis después de la respuesta inmune, previniendo el desarrollo de inmunopatologías. Estas células son distinguidas por ser positivas para CD25 y expresar el factor de transcripción Foxp3, definido por diversos autores como el gen maestro controlador del desarrollo y función de las células T reguladoras y es considerado como el principal marcador molecular de esta subpoblación aunque también se han descrito otros marcadores asociados con su estado de maduración y actividad funcional como CD45RA, CTLA4, CD62L, CCR7, GITR y CD103. Estas células se pueden generar en el timo donde requieren la combinación de fuertes señales antigénicas así como una máxima coestimulación y reciben el nombre de células T reguladoras naturales (nTregs) y expresan FOXP3. Pero también se pueden generar en la periferia a partir de linfocitos T vírgenes después del encuentro con antígenos propios o externos, en condiciones de coestimulación limitante y en función de las citocinas presentes en el momento de la activación y reciben el nombre de células T reguladoras inducibles (iTregs). Las células Tregs pueden suprimir las respuestas inmunológicas en múltiples pasos: mediante la producción de granzimas y perforinas que induce citotoxicidad en las células T efectoras, por el consumo de IL-2 que es necesaria para la proliferación celular, la secreción de moléculas supresoras como IL-10 y TGF- β y/o a través de mecanismos dependientes de contacto celular atenuando las funciones de las células presentadoras de antígenos (APC) que pueden promover anergia u apoptosis en la células T efectora. Ambas subpoblaciones de Tregs tienen la región TSDR del gen Foxp3 desmetilada, por lo que comparten un patrón global de expresión génica similar, estabilidad y fenotipo, aunque sus mecanismo de supresión pueden diferir entre ambos subtipos, las iTregs suprimen principalmente vía producción de citocinas inhibitoras mientras que las nTreg usan el contacto celular para ejercer su supresión. En este estudio observamos una reducción significativa de las Treg en correlación vs. los individuos sanos. Lo cual parece sugerir una deficiencia en los mecanismos que pueden contribuir a contender con la inflamación.

En este proyecto no encontramos diferencia en la expresión de células Bregs (CD19⁺/CD24^{hi}/CD38^{hi}/IL-10⁺ circulantes) en el grupo de pacientes con otoesclerosis en comparación con los controles sanos. Sin embargo, si se observó una tendencia a la disminución en el porcentaje de células Bregs de los pacientes.

Finalmente se conoce que las células dendríticas plasmacitoides reguladoras (pDCregs) son una subpoblación que expresan 2,3-dioxigenasa de indolamina (IDO), una enzima que participa en el metabolismo del triptófano, suprime la actividad de células T efectoras e induce la polarización de células Tregs. IDO es regulada positivamente durante la presentación antigénica y la unión de CTLA-4/B7-1/B7-2 (CD80/CD86) en los linfocitos y células dendríticas; en respuesta a la infección y a la presencia de ácidos nucleicos circulantes a través de la activación del TLR4 y TLR9; y por la inflamación tisular (TNF- α , PGE2, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$)⁶⁸ y son reguladoras críticas de la inmunidad adaptativa contribuyendo a la supresión del proceso inflamatorio.

En este estudio encontramos que el porcentaje de células CD123⁺ que expresan IDO, a nivel circulante, fue menor en el grupo de pacientes en comparación con controles sanos. Con base en nuestros resultados podemos sugerir que en la fisiopatogenia de la otoesclerosis existe la participación de procesos pro-inflamatorios y una deficiencia de los mecanismos de regulación de la inflamación.

En conclusión, en el presente estudio encontramos un incremento en el porcentaje de células Th22, Th17, Th1 y Th2 en los pacientes con otoesclerosis, mientras que el número de células T y pDCreguladoras pero no de Bregs se encuentra disminuido. Nuestros resultados sugieren que el balance entre las subpoblaciones de células pro- y antiinflamatorias favorece a la primera, con la incapacidad de la última de mantener la homeostasis.

Nuestros resultados contribuyen a elucidar el papel de diversas poblaciones celulares y citocinas en la fisiopatogenia de la otoesclerosis. Un conocimiento más profundo de estas redes de citocinas y células permitirá el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas más específicas para esta patología.

CONCLUSIONES:

Se conocen múltiples factores asociados a la otoesclerosis sin embargo falta un largo camino por dilucidar acerca de los mecanismos involucrados en su presentación y progreso, el conocer las citosinas involucradas nos amplía el campo de trabajo para conocer el papel que juegan cada una en esta patología.

ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO TITULADO: EXPRESIÓN DE FACTORES PROINFLAMATORIOS, ANTIINFLAMATORIOS, DE PROLIFERACIÓN Y SENESCENCIA EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON OTOESCLEROSIS

I. INTRODUCCIÓN

Es importante que lea y comprenda la siguiente explicación acerca de su enfermedad y/o de su familiar, y la posibilidad de que sea incluido en el estudio arriba mencionado, ésta describe claramente el propósito, beneficios y riesgos que condiciona el ingreso al estudio. También deberá entender que el hecho de rechazar su participación o de su familiar en el estudio no cambiará en absoluto las decisiones médicas que se tomen con respecto al tratamiento de la enfermedad.

La otoposclerosis es una enfermedad de depósito anormal de hueso en las estructuras del oído que lleva a una disminución de la audición progresiva, siendo inicialmente unilateral y posteriormente bilateral. La cirugía es el principal tratamiento sin ser curativa, sin embargo no se puede realizar en todos los pacientes. El realizar estudios sobre factores inmunológicos e inflamatorios de la enfermedad nos podría llevar a proponer un manejo diferente.

II. OBJETIVO

Yo (nombre de paciente o familiar) portador de Otoposclerosis _____ con dirección en _____ Voluntariamente acepto (nombre del paciente o familiar)

Firma _____

Participar en el estudio, cuyo propósito es demostrar, que existe una expresión aumentada de factores inflamatorios locales y sistémicos en la enfermedad de Otoposclerosis, y que esta expresión se encuentra relacionada con la manifestación macroscópica de la enfermedad.

Consideramos que usted o familiar es un candidato para ingresar al estudio, ya que presenta las características de tener el diagnóstico Otoposclerosis

III. PROCEDIMIENTOS

Estoy informado de que con la finalidad de confirmar la relación que tiene la expresión de citocinas proinflamatorias en la Otoposclerosis con el grado de manifestación macroscópica será necesario realizar un estudio estandarizado en el INER (que no conlleva a un riesgo adicional del ya establecido) y consiste en un interrogatorio y exploración física completa, realización de estudios análisis histopatológico (platina extraída durante la cirugía) y de inmunohistoquímica. He sido informado que el análisis de las muestras de sean realizadas en los Departamentos de Anatomía patológica del INER e Inmunología del INCMNSZ, los cuales cuentan con personal entrenado y calificado para realizar dichos procedimientos, además del material nuevo y esterilizado para cumplir con todas las medidas de control de calidad.

Se me realizara una punción venosa con extracción de 10ml de sangre para cubrir los objetivos del Proyecto de investigación cuyas muestras se evaluarán en Departamentos de Anatomía patológica e Inmunología del INCMNSZ. Se procesara la platina extraída durante el procedimiento quirúrgico sin ningún riesgo adicional a la cirugía pues es un paso para realizar esta.

IV. BENEFICIOS

Estoy informado que al conocer la fisiopatología de mi enfermedad desde el punto de vista inmunológico, será más factible el comprender por qué el grado de compromiso óseo se relaciona con las manifestaciones y la progresión de la enfermedad.

V. RIESGO

Yo (o familiar) seré (a) sometido a la extracción de 10ml de sangre venosa con riesgo de dolor en sitio de punción, hematoma, infección, sin algún otro riesgo agregado a los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que se realizan a los pacientes que tienen el diagnóstico de Otoposclerosis tales como la realización de la estapedectomía. La extracción de la platina forma parte del procedimiento quirúrgico (habitual) para la realización de una estapedectomía.

VI. ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si yo o mi familiar decidimos no participar en el estudio, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento serán iguales que en otros pacientes tratados en este Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

VII. CONFIDENCIALIDAD

Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre o el de mi familiar serán mencionados en el reporte del estudio.

VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

Se me ha informado que tendré disponibilidad en todo momento de la información de los resultados obtenidos en el análisis histopatológico y de inmunohistoquímica del tejido resecaado durante la estapedectomía, así como el resultado del análisis serológico realizado.

IX. CESION DE DERECHOS

La decisión de ingresar al estudio implica que la platina del estribo y las muestras sanguíneas quedan bajo la propiedad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y además implica que el instituto pueda realizar otras pruebas posteriormente sin necesidad de que sea informado de ello.

X. DERECHO A DESERTAR

Soy libre de excluirme del estudio en cualquier momento. En el caso de que tome esta decisión, el tratamiento y seguimiento no cambiarán.

México, D.F., a _____ de _____ de 2015

Testigo 1: Nombre _____

Parentesco _____

Identificación _____

Dirección _____

Testigo 2: Nombre _____

Parentesco _____

Identificación _____

Dirección _____

Dudas o informes comunicarse al Servicio de ORL del INER al teléfono (55) 54871700 Extensión 5121

Marcadores estudiados

	Citosina	Familia	Célula de origen	Función biológica	Resultado final
1	Ki-67	Proteína aislada	Núcleo Celular	Aumento de velocidad de la división celular	Proliferación celular
2	p16 ^{INK4a}	Proteína aislada	Citoplasma	Regulación del ciclo celular	Senescencia
3	IL-17A	Linfocitos T cooperadores TH17	Producida por las Cs T activadas	Inflamación crónica	Inflamación
4	IL-4	Cs T CD4	Leucocitos, Cs endoteliales	Proliferación de linfocitos B, mastocitos y linfocitos T, Síntesis de IgE, Inflamación eosinofílica, elimina parásitos	Inductora de fibrosis
5	IL-22	Th 17	Leucocitos, Cs endoteliales	Reparación de tejidos	Inflamación y protección de epitelios
6	TNF-a	Familia de receptores de TNF	Cs nucleadas	Reclutamiento de las células inflamatorias	Inflamación
7	IFN-g	Interferones tipo II	Linfocitos T y Natural Killer	Activación de los macrófagos y reclutación de monocitos.	Inflamación
8	IL-8	Quimiocinas	Fibroblastos, Cs endotelial, monocitos y macrófagos	Factor quimiotáctico de neutrófilos	Angiogénesis y quimiotáxis
9	TGF-b1	Superfamilia de factores de crecimiento transformante beta	Leucocitos	control del crecimiento celular, proliferación celular, diferenciación y apoptosis	Osteogenesis
10	BMP2/4	Superfamilia de proteínas TGF-beta	Plaquetas, Cs endoteliales, linfocitos y macrófagos	Diferenciación de los osteoblastos en diversos tipos celulares	Osteogenesis
11	IL-10	HLA clase II TH 2	Cs B y Natural Killer	Inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y macrófagos	Anti-inflamación
12	MMP-2	Proteínas de la matriz metaloproteína sa	Proteínas inactivas unidas a proteinasas extracelulares	Función degradativa de la matriz extracelular	Degradación de la matriz extracelular
13	MMP-9	Proteínas de la matriz metaloproteína sa	Proteínas inactivas unidas a proteinasas extracelulares	Función degradativa de la matriz extracelular	Degradación de la matriz extracelular
14	Foxp3	Familia de reguladores transcripcionales Tfh	Cs T reguladoras	Regulador en el desarrollo y función de las células T reguladoras	Regulador

BIBLIOGRAFIA

- [1] Karosi T, Szekanecz Z, Sziklai I. Otoesclerosis: An autoimmune disease? *Autoimmunity Reviews* 2009;9(2):95–101
- [2] Szikíai I, Batta TJ, Karosi T. Otoesclerosis: an organ-specific inflammatory disease with sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaringol* 2009;266(11):1711-8.
- [3] Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP, Michaels L, Liang J, Qiu JP, Van De Heyning P. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. *Otol Neurotol* 2001;22(5):596–602.
- [4] Niedermeyer HP, Gantumur T, Neubert WJ, Arnold W. Measles virus and otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol* 2007;65:86–92.
- [5] Liktó B, Csomó P, Karosi T. Detection of otosclerosis-specific measles virus receptor (cd46) protein isoforms. *ISRN Otolaryngol* 2013;2013:479482.
- [6] Weegerink NJ, Schrauwen I, Huygen PL, Pennings RJ, Cremers CW, Van Camp G, Kunst HP. Phenotype of the first otosclerosis family linked to OTSC10. *Laryngoscope* 2011;121(4):838–45.
- [7] Van Den Bogaert KP, Govaerts J, De Leenheer EMR, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone* 2002;30(4):624–30.
- [8] Ealy M, Smith RJ. The genetics of otosclerosis. *Hear Res* 2010;266(1- 2):70–4.

[9] Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423(6937):349-55.

[10] Li W, Yu B, Li M, Sun D, Hu Y, Zhao M, Cui CB, Hou S. NEMO-binding domain peptide promotes osteoblast differentiation impaired by tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(2):1228–33.

[11] Karosi T, Jókay I, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylotic stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope* 2006;116(8):1427-33.

[12] Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Pytel J, Jóri J, Szalmás A, Sziklai I. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor-alpha mRNA in otosclerotic stapes footplates. (2005) *Laryngoscope* 2005;115(7):1291-7.

[13] Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296(5573):1634-5.

[14] Lukić IK, Grcević D, Kovacić N, Katavić V, Ivcević S, Kalajzić I, Marusić A. Alteration of newly induced endochondral bone formation in adult mice without tumour necrosis factor receptor 1. *Clin Exp Immunol* 2005;139(2):236–44.

[15] Csomor P, Sziklai I, Karosi T. TNF-alfa receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009;30(8):1131-7.

[16] Malafronte G, Filosa B, Cantone E. New macroscopic classification of stapedio-ovalar otosclerosis: a simplified rating for training in stapedotomy. *Otol Neurotol* 2008;29(7):889-92.

[18] Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation.

Laryngoscope 2002;112(9):1627–34.

[19] Khalfallah A, Schrauwen I, Mnejja M, Hadjkacem H, Dhouib L, et al. Association of COL1A1 and TGFB1 polymorphisms with otosclerosis in a Tunisian population. *Ann Hum Genet* 2011;75(5):598-604.

[20] Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. *J Hum Genet* 2002;47(9):478–83.

[21] Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Franssen E, Ealy M, Cremers CW, Van De Heyning P, Vincent R, Offeciers E, Smith RH, van Camp G. Detection of rare nonsynonymous variants in TGFB1 in otosclerosis patients. *Ann Hum Genet* 2009;73(2):171–5.

[22] Richard C, Doherty JK, Fayad JN, Cordero A, Linthicum FH Jr. Identification of target proteins involved in cochlear otosclerosis. *Otol Neurotol* 2015;36(5):923–31.