

# TITULACIÓN DE ANTICUERPOS ANTICOCLEARES MEDIANTE *WESTERN-BLOT* Y GRADO DE RECUPERACIÓN AUDITIVA TRAS CORTICOTERAPIA EN PACIENTES CON SORDERA SÚBITA

F. J. GARCÍA CALLEJO, M. M. VELERT VILA\*, P. LAPORTA\*\*, M. H. ORTS ALBORCH, C. DE PAULA  
VERNETTA, J. MARCO ALGARRA

SERVICIO DE ORL. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA.

\*CENTRO DE INVESTIGACIÓN. HOSPITAL LA FE. VALENCIA.

\*\*DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA.

## RESUMEN

**O**bjetivos: La detección de anticuerpos anticocleares en pacientes con sordera súbita (SS) varía entre el 5 y el 41% según autores. Se intenta correlacionar el nivel de anticuerpos detectados por *Western-blot* (WB) con la hipoacusia. *Pacientes y métodos*: 49 sujetos con SS y WB positivo frente a antígeno coclear bovino. Se midió el porcentaje de pérdida auditiva al debut y posterior recuperación tras tratamiento con deflazacort 1 mg/kg/día mediante audiometría, así como el título de anticuerpos anticocleares

cuantificados por dilución de los sueros. *Resultados*: La pérdida inicial fue del 49,4±20,6% y del 15,9±18,0% tras corticoterapia. No existió correlación estadísticamente significativa entre títulos y pérdida auditiva ( $y=0,1122x+30,613$ ;  $R^2=0,7552$ ) ni entre títulos y recuperación ( $y=-0,0818x+87,65$ ;  $R^2=0,3229$ ). *Conclusiones*: Aunque se acepta la capacidad predictiva de respuesta al tratamiento del WB, en pacientes con SS la cuantificación de títulos no permite pronosticar el porcentaje de recuperación auditiva.

**PALABRAS CLAVE:** Sordera brusca. Enfermedad autoinmune del oído interno. Hipoacusia neurosensorial. *Western-blot*. Autoanticuerpos.

## ABSTRACT

### ANTICOCLEAR ANTIBODIES TITLES MEASURED BY WESTERN-BLOT AND HEARING RECOVERY LEVEL AFTER CORTICOID THERAPY IN PATIENTS WITH SUDDEN DEAFNESS

**O**bjectives: Detection of antichoclear antibodies in patients with sudden deafness (SD) ranges from five to forty one percent depending on authors. We tried to correlate the level of antibodies measured by *Western-blot* (WB) and hearing loss. *Patients and methods*: Forty nine subjects bearing of SD and a positive WB for bovine cochlear antigen. Hearing loss average was measured at the onset and after treatment with deflazacort 1 mg/kg per day by means of audiometry, and antibody titles were

quantified in the diluted sera. *Results*: Initial loss was 49.4±20.6%, and after corticotherapy it was 15.9±18.0%. There was no statistically significant correlation titles-hearing loss ( $y=0.1122x+30.613$ ;  $R^2=0.7552$ ) nor titles-recovery ( $y=-0.0818x+87.65$ ;  $R^2=0.3229$ ). *Conclusions*: Although predictive capability for treatment response is accepted for WB, quantifying of the antibody titles in patients with SD does not allow to make a prognosis about the average hearing recovery.

**KEY WORDS:** Sudden deafness. Inner ear autoimmune disease. Sensorineural hearing loss. *Western-blot*. Autoantibodies.

**Correspondencia:** Francisco Javier García Callejo. C/ Luis Oliag 71-8. 46006 Valencia. E-mail: jgarciaall@hotmail.com.

Fecha de recepción: 30-8-2004

Fecha de aceptación: 2-10-2004

## INTRODUCCIÓN

La sordera brusca (SB) puede considerarse en la actualidad una de las escasas circunstancias audiológicas condicionantes de actuación urgente. Su pronóstico en cuanto a recuperación funcional se encuentra muy íntimamente relacionado a la brevedad en la instauración del tratamiento. Este, por otro lado, ha incluido según escuelas grupos farmacológicos con efecto vasodilatador, reactivo, neuroprotector, antiagregante, anticoagulante e inmunomodulador, siendo el principal representante de estos últimos, y el más comúnmente aceptado entre autores, los glucocorticoides<sup>1,2</sup>.

Tan variado arsenal obedece al general desconocimiento que de su mecanismo de producción se ha tenido en las últimas décadas. García Berrocal ha sistematizado muy acertadamente las diversas teorías fisiopatológicas emitidas –deterioro de la microvascularización coclear, viriasis, rotura de membranas laberínticas, hipersensibilidad, agresión coclear directa– reforzando aquella que promueve la pérdida de reactividad inmunológica sobre el entorno laberíntico con el consiguiente daño local secundario a activación celular y humoral con mayor o menor especificidad<sup>3</sup>.

Esta activación de los mecanismos de defensa inmunes contra estructuras propias del individuo condicionan el fundamento de las enfermedades autoinmunes. La mejoría auditiva tras corticoterapia, las características epidemiológicas de la población más frecuentemente afecta, la objetivación de parámetros indicadores de inflamación o inmunomediación alterados y la comorbilidad con otros desórdenes autoinmunes clásicamente reconocidos hacen de la SB una potencial manifestación de la enfermedad autoinmune del oído interno, descrita por McCabe en 1979<sup>4</sup>. El hallazgo de anticuerpos con afinidad sobre estructuras laberínticas ha permitido definir la enfermedad inmunomediada del oído interno como una entidad bien diferenciada de otras sorderas y aún más, incluso pronosticar su buena respuesta a la corticoterapia hasta ahora empírica. Aunque ello está especialmente documentado en hipoacusias neurosensoriales de progresión rápida<sup>5-7</sup>, la teoría inmunopatogénica también oferta la peculiaridad clínica de un debut súbito<sup>3,8,9</sup>.

Los pacientes con SB son de relativo fácil diagnóstico y su manejo ha sido ampliamente protocolizado. Asimismo, resulta en la actualidad sencillo cuantificar de una forma objetiva la pérdida auditiva de un individuo. En la actualidad, la determinación de anticuerpos anticocleares se efectúa mediante la realización de una prueba de

*Western-blot* (WB) enfrentando suero del sujeto afecto a un extracto coclear, y sus títulos son emitidos cualitativamente. Pues bien, quizás la semicuantificación de estos títulos mediante diluciones seriadas de los sueros con WB previamente conocido y positivo pudiera correlacionarse con la gravedad del proceso y la capacidad de respuesta del organismo tras corticoterapia. Es nuestro interés demostrar esta la potencial relación.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Entre julio de 1994 y junio de 2003 se atendió un volumen de 49 sujetos con SB en los que se detectó un test de WB positivo frente a extracto antigénico de cóclea bovina. Se entiende como SB la pérdida auditiva perceptiva superior a 30 dB HL en tres o más frecuencias consecutivas en un tiempo de instauración inferior a las 72 horas. Esta sordera, mayormente por deterioro coclear, se instaura en un oído sin poderse filiar su etiología, lo cual condicionará su diagnóstico por exclusión de otras causas. Otros autores incluyen en su definición su susceptibilidad por asociar cortejo sintomático estado-acústico variable y su capacidad de reversibilidad y recurrencia<sup>10</sup>. Todo ello permitiría el desarrollo de protocolos de pronóstico y tratamiento de rápida aplicación destinados a la prevención y recuperación funcional del trastorno neurosensorial.

Resultaron requisitos de inclusión en el estudio un tiempo de evolución entre el debut clínico y el inicio del tratamiento no superior a las 96 horas, el cumplimiento íntegro de la pauta terapéutica prescrita, la absoluta normalidad en el estudio de imagen de la vía acústica mediante Resonancia Magnética Nuclear y, por supuesto, la detección de al menos una banda en el test de WB efectuado en suero del paciente.

No condicionaron exclusión del estudio la presencia de patología concomitante o la asociación de tratamientos médicos siempre y cuando estos no tuvieran efecto inmunomodulador o eventual potencial ototóxico.

La pauta terapéutica administrada en todos los casos fue la asociación de piracetam y corticoides. El primero se pautó a dosis de 9 g/día por vía intravenosa –durante el período de ingreso hospitalario del sujeto, de 5 a 8 días–, y entre 2,4 y 3,6 g/día por vía oral durante los dos meses del seguimiento. Los segundos se administraron también inicialmente por vía intravenosa y consistió en metil-prednisolona a dosis de 1 mg/kg/día durante el ingreso, para pasar a continuación a deflazacort

60 mg/día por vía oral hasta cumplir 45 días desde el debut clínico, con reducción progresiva hasta su anulación en los 15 días siguientes. El test de WB fue desarrollado usando como extracto antigénico cóclea bovina. El mismo fue obtenido mediante fresado temporal y aspirado de las membranas vestibulares en peñascos de vacas sacrificadas en un tiempo inferior a 72 horas. El tejido laberíntico fue imbibido en solución tamponada de fosfato salino PBS para proceder con él conforme al diseño propuesto por Moscicki<sup>11</sup>: lavado, centrifugación a 1000 g y 4°C, decantación del sobrenadante, de nuevo imbibición en PBS con homogeneización en vórtex, triple sonicación, nueva centrifugación a 16.000 g y 4°C y decantación del sobrenadante con filtrado del mismo sobre filtros de porosidad 0,2 micras de diámetro. La concentración proteica de la solución fue determinada mediante fotodensitometría óptica a longitudes de onda de 225 y 215 nm, conforme al modelo de Waddell<sup>12</sup>. La muestra así obtenida resulta estable a -70°C durante un tiempo no superior a los 3 meses.

Un volumen de 10 µl de la solución con extracto coclear se diluyó 1:1 (v/v) en solución tamponada de SDS, listo para distribuirse en los pocillos de láminas con gel de poliacrilamida al 8%, expuestos en cámara de electroforesis a una corriente continua de 40 mA según el modelo de Laemmli<sup>13</sup>. Se efectuó una transferencia a una fase de nitrocelulosa mediante una unidad transforética con corriente continua de 150 mA, con posterior incubación en buffer Tween-TRIS (TT).

El extracto así migrado fue enfrentado a muestras séricas de los pacientes estudiados diluidas al 1:10 (v/v) en buffer TT y posteriormente incubadas a 4°C durante 8 horas, para efectuárseles a continuación un ensayo de inmunoadsorción con antisuero conjugado a una fosfatasa alcalina y posterior adición de un cromógeno fosfato.

Cuando la realización del WB detectó la presencia de alguna banda, se efectuó nuevamente la técnica con patrones séricos diluidos en las proporciones 1:32, 64, 128, 256..., y así sucesivamente hasta dejar de visualizarse la banda. La última concentración positiva correspondió a la titulación.

En todos los pacientes estudiados se efectuó el mismo día el estudio audiométrico y la extracción en sangre periférica para determinación de autoanticuerpos. Esta valoración se realizó el día en el que el paciente consulta, previo a instaurar la corticoterapia y a los 60 días de la anterior, momento en que el tratamiento esteroideo llega a su fin.

El porcentaje de pérdida auditiva monoaural se efectuó mediante Audiometría Tonal Liminar, mediante valoración del umbral por vía aérea en las

frecuencias de 500, 1.000, 2.000 y 3.000 Hz, conforme a la valoración reglada por el Real Decreto 1971/1999, de 23 de diciembre, de Procedimiento para el Reconocimiento, Declaración y Calificación del Grado de Minusvalía (BOE de 26 de enero y 13 de marzo de 2000), en su Anexo 1A, Capítulo 13.

El tratamiento estadístico de los datos registrados incluyó la prueba de *t*-Student para comparación de medias y desviaciones estándar. Cuando se quisieron correlacionar dos variables cuantitativas se calculó el coeficiente R<sup>2</sup> proporcionado por la determinación de las ecuaciones de las rectas de regresión lineal. Los análisis fueron efectuados con el modelo CROSSTAB para comparación de parámetros que integra el paquete informático SPSS. Fueron considerados estadísticos significativos aquellos que condicionaron *p*<0,001.

## RESULTADOS

La edad media de los 49 sujetos examinados fue de 39,86±10,88 años, con variaciones entre 19 y 62. Existió predominio entre mujeres a razón H/M=22/27=0,81. En ellos el umbral auditivo por vía aérea detectado en el debut del episodio de SBI en el oído afecto se muestra en la figura 1.

De acuerdo con el Real decreto regulador de minusvalías, la pérdida auditiva media en el momento del debut clínico fue del 49,45±20,69%, con variaciones entre el 15 y el 100%. En este momento de la evolución del paciente la titulación de anticuerpos anticocleares fue siempre positiva, con rangos detectados entre 1/32 y 1/512. La distribución del volumen muestral según la dilución máxima en que se detectasen se representa en la figura 2. En cuatro individuos se observó la presencia

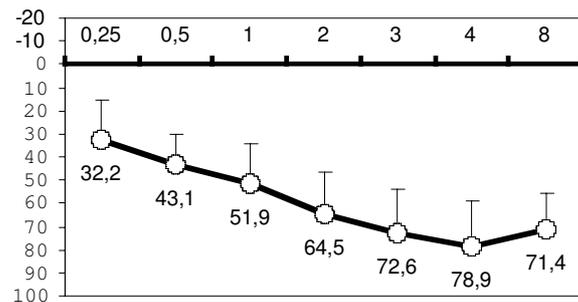


Figura 1. Umbral auditivo medio por vía aérea obtenido de la Audiometría Tonal Liminar practicada sobre el oído afecto de SBI entre pacientes con anticuerpos anticocleares detectados mediante WB.

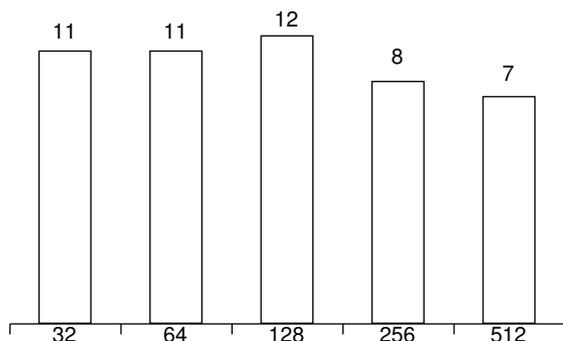


Figura 2. Distribución del volumen muestral de pacientes con SBI (n=49) según la dilución máxima a la que fueron detectados anticuerpos anticocleares mediante WB.

de dos bandas en el WB efectuado. La banda más frecuentemente detectada migró en el peso molecular de 68 kD, en 43 oídos. En otros 7 casos se detectó banda en 220 kD, y en otros 3, en 33-35 kD.

El porcentaje de pérdida auditiva a los 2 meses del debut clínico fue del  $15,92 \pm 18,03\%$ , con oscilaciones entre el 0 y 61 (71,2%). Esta diferencia audiométrica resultó estadísticamente significativa con el momento del debut de la enfermedad ( $t=8,5524$ ,  $p<0,001$ ), siendo la recuperación auditiva media del  $73,91 \pm 23,07\%$ , con variaciones entre el 20,89 y el 100%. Todos los pacientes expresaron en mayor o menor medida mejoría auditiva subjetiva y registrada audiométricamente. El período de tiempo medio en que el individuo observó esta recuperación de la audición fue de  $14,8 \pm 9,7$  días, con variaciones entre las 48 horas y los 45 días.

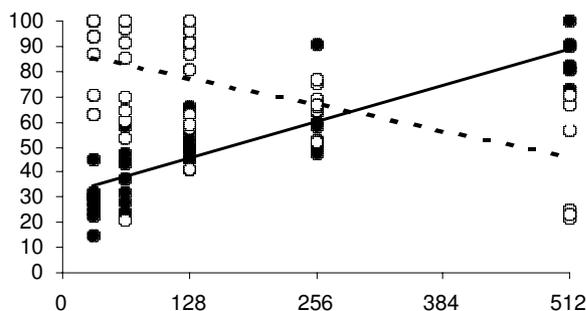


Figura 3. Rectas de regresión lineal resultantes de comparar títulos de autoanticuerpos (abscisas) con porcentaje de pérdida auditiva al debut (●, línea continua) y de recuperación a los dos meses (○, línea discontinua). Existió tendencia estadísticamente no significativa a correlacionar elevación en las titulaciones con mayor pérdida auditiva ( $y=0,1122x+30,613$ ,  $R^2=0,7552$ ) e inferior capacidad de recuperación ( $y=-0,0818x+87,65$ ,  $R^2=0,3229$ ).

El cálculo de ecuaciones de rectas de regresión lineal permitió observar entre los pacientes una tendencia a presentar títulos más elevados de autoanticuerpos en aquellos sujetos que evidenciaron mayor pérdida auditiva inicial y a la vez menor capacidad de recuperación. Esta tendencia se refleja en la figura 3.

El porcentaje de recuperación auditiva a los dos meses de iniciado el cuadro también se correlacionó mediante el cálculo de las rectas de regresión lineal con el umbral de audición por vía aérea medido en el día del debut clínico del cuadro de SBI, así como con la edad del paciente, y con el tiempo en días que el paciente tardó en expresar mejoría. En ninguno de los casos pudieron establecerse relaciones estadísticamente significativas, como se refleja en la tabla 1.

Tabla 1: Ecuaciones de las rectas de regresión lineal resultantes de comparar el porcentaje de recuperación auditiva a los dos meses de instaurado el cuadro con el umbral medio de audición en las frecuencias de 500, 1000, 2000 y 3000 Hz, así como con la edad del paciente afecto y con el tiempo que el individuo tardó en presentar sensación de mejoría

	Ecuación	R <sup>2</sup>	Significación estadística
Umbral en 500 Hz	$y=-0,2397x+60,883$	0,1731	No significativo
Umbral en 1000 Hz	$y=-0,4238x+83,26$	0,3041	No significativo
Umbral en 2000 Hz	$y=-0,4562x+98,206$	0,3439	No significativo
Umbral en 3000 Hz	$y=-0,466x+107,09$	0,3311	No significativo
Edad	$y=-0,239x+57,521$	0,2569	No significativo
Días en observar recuperación	$y=-0,3306x+35,512$	0,62	No significativo

## DISCUSIÓN

En la génesis de la SB han sido involucradas diversas teorías. Los hallazgos clínicos, epidemiológicos y de pruebas complementarias hacen de ellas hipótesis aceptables y a la vez no excluyentes entre sí. La inmunomediación ha resultado también una posibilidad causal casi a la vez que el laberinto perdía su presunta capacidad de santuario inmunológico. La detección de células inmunocompetentes en el saco endolinfático permitía así justificar actividad flogística contra determinantes antigénicos del órgano de Corti secundario a una respuesta defensiva inespecífica bien a nivel local o sistémico, esta última condicionada a través de la vena espiral del modiollo y sus vénulas colectoras.

La síntesis de inmunoglobulinas en el oído interno depende de la quimiotaxis leucocitaria que activan algunas interleucinas de expresión acelerada en el saco endolinfático<sup>14</sup>. Sincrónicamente al proceso inflamatorio, García Berrocal ha confirmado que tanto el órgano de Corti como la estría vascular y el ganglio espiral desarrollan una espesa trama extracelular que se fibrosa y tiende a la osificación del órgano sensorial y su sistema nutricional, a la vez que generan lesiones granulomatosas de distribución limitada al aparato celular de soporte del aparato sensorial<sup>15-17</sup>.

El autoanticuerpo puede tener asimismo naturaleza sistémica y aún más, presentar una actividad patógena más clásica de un proceso vasculítico que un mero agente selectivo de daño coclear, como demuestran las referencias sobre detección de anticuerpos anticardiolipina, anticélulas endoteliales y anticitoplasma de neutrófilo<sup>18-20</sup>. Otros anticuerpos frente a sustratos extracelulares y sobre todo antinucleares evidencian variable graduación de positividad en pacientes con SB y condicionan la duda razonable de estar presenciando una manifestación más de una enfermedad autoinmune sistémica o bien la asociación nada infrecuente de diversas entidades autoinmunes más o menos focales entre sí<sup>21</sup>. Hirose, sin embargo, minimiza la validez clínica de positivación de otros autoanticuerpos no antinucleares, catalogándolos como peculiaridades acompañantes de una afección sistémica, carentes de cualquier implicación diagnóstica o pronóstica<sup>22</sup>.

Sea como fuere el proceso inflamatorio que envuelve al paciente con SB es un hecho corroborado en las pruebas en sangre periférica efectuadas por muy diversos autores, al detectar repetidamente modificaciones en la velocidad de sedimentación globular, el factor reumatoide, los títulos de in-

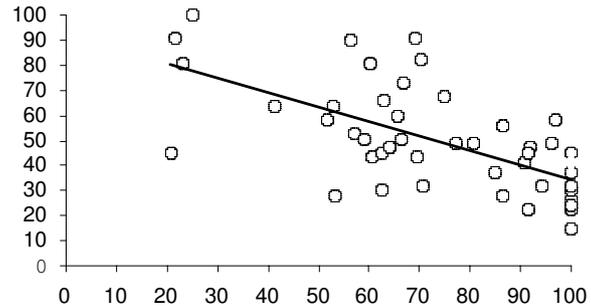


Figura 4. Recta de regresión lineal obtenida de la comparación de los datos de porcentaje de recuperación auditiva a los dos meses del debut (abscisas) y de pérdida al inicio de la enfermedad (ordenadas). La ecuación resultante fue  $y = -0,58x + 92,323$ ,  $R^2 = 0,4183$ , no significativa.

munoglobulinas totales o factores del complemento, los reactantes de fase aguda o las subpoblaciones linfocitarias<sup>24-26</sup>.

Todo lo anterior sin embargo describe marcadores inmunológicos poco específicos. En la década de los noventa se promovió la detección de anticuerpos frente a una proteína de 68 kD mediante la técnica de WB, proteína que ha sido relacionada con la familia de las HSP (*Heat Shock Protein*) de 70 kD. Serían estas un grupo de proteínas estructurales e inducidas con efecto regulador al velar por el correcto funcionamiento de la matriz celular al retirar los polipéptidos dañados en entornos hostiles a la homeostasis: hipoxia, infección, quimiotoxicidad y, obviamente, el calor. La determinación de tales anticuerpos se ha correlacionado bien con cuadros de hipoacusia de rápida progresión y naturaleza perceptiva, pero definen mejor a la enfermedad descrita inicialmente por McCabe por su bilateralidad, asociación a otros desórdenes inmunomediados, evolución cronobiológica en meses y adecuada respuesta a la corticoterapia<sup>4</sup>.

Sin embargo, la presencia de un WB positivo para anticuerpos frente a proteínas de 68 kD en casos de SB obliga a una actividad humoral tremendamente acelerada. Por ello quizás su detección tenga más carácter de epifenómeno acompañante que un auténtico factor desencadenante de la enfermedad. Diversas series hablan sin embargo de incidencias elevadas de pacientes con SB y WB positivo y de correlación con la respuesta al tratamiento<sup>5,24,27,28</sup>. Otros autores sin embargo defienden la modulación celular T como mecanismo activador del proceso al destacar el descenso en el conteo porcentual de T4 y T8 al debut de la SB, con posterior corrección en especial de las formas T helper si existe respuesta adecuada al tratamiento<sup>28,29</sup>.

Esta diversa consideración que de la prueba de WB se tiene entre autores parece ligada a la escasa estandarización efectuada sobre la técnica de ensayo y las premisas establecidas en la investigación sobre lo que se considera seropositivación o no. La escasa sensibilidad atribuida por Hirose al WB, un 42%<sup>24</sup>, podría ser consecuencia de la evolución del cuadro inmunológico días o incluso meses antes del debut clínico, y por tanto ser un sesgo dependiente de la cronobiología de la enfermedad, como ha adelantado García Berrocal para cuadros de hipoacusias rápidamente progresivas, pero no de instauración súbita<sup>30</sup>. Otros autores encuentran la misma incidencia de resultados positivos para el WB en sujetos con SB que en individuos normoacúsicos sanos<sup>7,31,32</sup>.

Sea como fuere, sigue admitiéndose que la positividad en el WB sí se correlaciona bien con la respuesta a la corticoterapia en pacientes con SB<sup>5,22,24,27</sup>. Esta aceptación, pero sobre todo el hecho de que aun hoy siga permitiéndose como criterio diagnóstico de enfermedad inmunomediada la resolución del cuadro con corticoides, ha generado una idea simple pero a la vez no ensayada: el poder cuantificar la titulación del marcador inmunológico como eventual medida de pronóstico. Los resultados ofertados no han sido inicialmente esperanzadores. La explicación a esta iniciativa fallida podría hallarse en la posibilidad de que el marcador elegido, la familia de HSP-70, sea realmente un fenómeno fisiopatológico paralelo, quizás más consecuencia que causa de la enfermedad. Debe asumirse también que la técnica carece todavía de adecuada estándares de referencia, ya que cada escuela trabaja extractos antigénicos pertenecientes a diferentes especies animales e incluso a diferentes órganos. En nuestra opinión, la asumida universalidad de las HSP-70 no justifica las variaciones técnicas en el enfrentamiento antígeno-anticuerpo que cada autor propone en su investigación. Las circunstancias definidas como seropositivaciones en el WB son además diferen-

tes entre estos mismos autores, al definir previamente búsqueda de distintas familias de HSP y no exclusivamente las de peso molecular entre 68 y 70 kD. La titulación de autoanticuerpos detectados mediante WB hoy en día carece de fiabilidad pronóstica en individuos afectados de SB, ya que no proporciona más información que la simple determinación cualitativa en suero virgen de la banda patológica de 68-70 kD.

García Berrocal no le confiere a este hallazgo papel causal, y fundamenta el diagnóstico de sordera inmunomediada a la presencia de tres de estos cinco criterios: 1. Bilateralidad; 2. Enfermedad autoinmune sistémica asociada; 3. Elevación en los títulos de anticuerpos antinucleares; 4. Disminución en las células CD4+; 5. Recuperación funcional tras corticoterapia  $\geq 80\%$ . Si sólo se cumplieran dos de ellos sería preciso verificar dos de estos otros cuatro criterios menores para sospechar autoinmunidad: 1. Unilateralidad; 2. Edad media y sexo femenino; 3. WB positivo frente a HSP-70; y 4. Algún tipo de recuperación auditiva tras tratamiento<sup>33</sup>. Y es que, a fecha de hoy, el diagnóstico de enfermedad autoinmune del oído interno entre pacientes con SB se acepta mayormente por las consideraciones clínicas y de respuesta al tratamiento que por la tipificación de laboratorio.

## CONCLUSIONES

Los pacientes con SB en los que se ha efectuado un test de WB para detectar anticuerpos anticocleares en la banda de 68-70 kD y ha resultado positivo presentan un mejor pronóstico de respuesta al tratamiento esteroideo que aquellos que han resultado negativos.

La semicuantificación de estos anticuerpos en forma de titulaciones seriadas por dilución no ha permitido pronosticar la intensidad de la hipoacusia ni su reversibilidad con corticoterapia en sujetos afectados de SB.

## REFERENCIAS

- 1.- García Berrocal JR, Vicente J, Arellano B, González F, Ramírez Camacho R. Laberintitis experimental autoinmune: evaluación de diversos modelos en cobayas. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 48: 5-10.
- 2.- García Berrocal JR, Arellano B,
- 3.- Vargas JA, Trinidad A, Ramírez Camacho R, Vergara J. Enfermedad inmunomediada del oído interno. Presentación de casos clínicos. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 48: 565-70
- 4.- McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979; 88: 585-9.
- 5.- Veldman JE. Immune-mediated sensorineural hearing loss with or without endolymphatic hydrops: a clinical and experimental approach. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 830: 179-86.
- 6.- Koc A, Sanisoglu O. Sudden sensorineural hearing loss: literature sur-

- vey on recent studies. *J Otolaryngol* 2003; 32: 308-13.
- 7.- Naumann A, Hempel JM, Schorn K. Nachweis einer humoralen immunreaktivitat gegen innenohrproteine bei patienten mit einer sensorineuralen schwerhorigkeit. *Laryngorhinootologie* 2001; 80: 237-44.
- 8.- García Berrocal JR, Ramírez Camacho R, Millán I, Górriz C, Trinidad A, Arellano B, et al. Sudden presentation of immuno-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003; 117: 775-9.
- 9.- Campbell KC, Klemens JJ. Sudden hearing loss and autoimmune inner ear disease. *J Am Acad Audiol* 2000; 11: 361-7.
- 10.- García Callejo FJ, Marco Algarra J, Blay Galaud L. Sordera brusca idiopática. En: Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco Algarra J, Medina J, Ortega del Alamo P, Trinidad Prieto J, eds. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Guadalajara: Ed. Proyectos Médicos; 2000: 1435-52.
- 11.- Moscicki RA, San Martín JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. *JAMA* 1994; 272: 611-6.
- 12.- Waddell WJ. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *J Lab Clin Med* 1956; 48: 311-4.
- 13.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 14.- Iwai H, Tomoda K, Sugiura K, Inaba M, Ikehara S, Yamashita T. T cells infiltrating from the systemic circulation proliferate in the endolymphatic sac. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108: 1146-50.
- 15.- García Berrocal JR, Ramírez Camacho R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J Laryngol Otol* 2000; 114: 101-7.
- 16.- García Berrocal JR, Ramírez Camacho R, Zurita M, Arellano B. La respuesta celular inmune precoz en la laberintitis experimental: estudio inmunohistoquímico. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2000; 51: 557-61.
- 17.- García Berrocal JR, Ramírez Camacho R, Trinidad A, Zurita M, De la Fuente R, Lobo D. Controversies and criticisms on designs for experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113: 404-10.
- 18.- Cadoni G, Fetoni AR, Agostino S, De Santis A, Manna R, Ottaviani F, et al. Autoimmunity in sudden sensorineural hearing loss: possible role of anti-endothelial cell autoantibodies. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002; (548): 30-3.
- 19.- Ottaviani F, Cadoni G, Marinelli L, Fetoni AR, De Santis A, Romito A, et al. Anti-endothelial autoantibodies in patients with sudden hearing loss. *Laryngoscope* 1999; 109: 1084-7.
- 20.- Toubi E, Ben David J, Kessel A, Podoshin L, Golan TD. Autoimmune aberration in sudden sensorineural hearing loss: association with anti-cardiolipin antibodies. *Lupus* 1997; 6: 540-2.
- 21.- García Berrocal JR, Ramírez Camacho R, Vargas JA, Millán I. Does the serological testing really play a role in the diagnosis immune-mediated inner ear disease? *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 243-8.
- 22.- Hirose K, Wener MH, Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1999; 109: 1749-54.
- 23.- Mathews J, Rao S, Kumar BN. Autoimmune sensorineural hearing loss: is it still a clinical diagnosis? *J Laryngol Otol* 2003; 117: 212-4.
- 24.- García Callejo FJ, Marco Algarra J, Martínez Beneyto MP, Orts Alborch MH, Morant Ventura A. Autoimmune identification of sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2003; 123: 168-71.
- 25.- Loughran S. Management of sudden sensorineural hearing loss: a consultant survey. *J Laryngol Otol* 2000; 114: 837-9.
- 26.- Nordang L, Laurent C, Mollnes TE. Complement activation in sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 633-6.
- 27.- Veldman JE, Hanada T, Meeuwssen F. Diagnostic and therapeutic dilemmas in rapidly progressive sensorineural hearing loss and sudden deafness. A reappraisal of immune reactivity in inner ear disorders. *Acta Otolaryngol* 1993; 113: 303-6.
- 28.- Mayot D, Bene MC, Dron K, Perrin C, Faure GC. Immunologic alterations in patients with sensorineural hearing disorders. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 41-5.
- 29.- García Berrocal JR, Vargas JA, Ramírez Camacho R, González FM, Gea Banacloche JC, Vergara J, et al. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 712-7.
- 30.- García Berrocal JR. Sordera súbita de origen inmunomediado. En: García Berrocal JR, ed. *Enfermedad inmunomediada del oído interno*. Barcelona: Ed. Ars Medica; 2004: 97-111.
- 31.- García Berrocal JR, Ramírez Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the western-blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope* 2002; 112: 304-9.
- 32.- Samuelsson AK, Hyden D, Roberg M, Skogh T. Evaluation of anti-hsp 70 antibody screening in sudden deafness. *Ear Hear* 2003; 24: 233-5.
- 33.- Yeom K, Gray J, Nair TS, Arts HA, Telian SA, Disher MJ, et al. Antibodies to HSP-70 in normal donors and autoimmune hearing loss patients. *Laryngoscope* 2003; 113: 1770-6.