

MÁRCIA AKEMI KII

Perfil de auto-anticorpos na surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Otorrinolaringologia
Orientadora: Prof. Dra. Tanit Ganz Sanchez**

**São Paulo
2004**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Hideo e Amélia
pelo apoio e confiança,
por tudo o que sou.

Ao eu marido Ernesto,
fonte de amor, amizade, perseverança e justiça,
pelos momentos mais felizes.

À minha tia Margarida
sempre presente
nos momentos mais importantes.

À família Asaumi
minha nova família,
pelo carinho e respeito.

Ao meu avô Matsuo (*in memoriam*)
fonte de bondade e sabedoria
por estar sempre ao nosso lado...

AGRADECIMENTOS

A **todos os pacientes** que compartilharam comigo não só sua dor, sua ansiedade, mas também a sua satisfação. Que tanto confiaram, tanto me ensinaram e continuam ensinando...

Ao Prof. Dr. **Aroldo Miniti**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pelo constante incentivo e orientação durante toda a nossa formação.

Ao Prof. Dr. **Ossamu Butugan**, Professor Associado da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pelo exemplo de dedicação, respeito e competência. Por suas palavras nas horas mais difíceis.

À Profa. Dra. **Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá**, Professora Titular da Disciplina de Reumatologia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e por seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Erasmu Magalhães Castro de Tolosa**, Professor Titular da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, por permitir o nosso acesso aos ossos temporais de cães.

Ao Dr. **Marco Aurélio Bottino**, Chefe do Setor de Otoneurologia da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HCFMUP, pelo incentivo e por nos permitir desenvolver esta pesquisa em seu setor.

Ao Dr. **Edigar Rezende de Almeida**, pela orientação, pelo entusiasmo e pelas orelhas bovinas.

À Dra. **Tanit Ganz Sanchez**, a quem admiro por sua ética, competência e por sua sincera amizade. Mais do que orientadora, uma amiga.

Às Dras. **Roseli Saraiva Moreira Bittar** e **Maria Cecília Lorenzi**, por estarem sempre presentes, nas melhores e piores horas. A quem devo muito.

À Dra. **Vilma S.Trindade Viana**, Chefe do Laboratório de Imunologia Humoral, nova amiga, sempre verdadeira, responsável pelos mais importantes ensinamentos da vida.

À Dra. **Tanit Ganz Sanchez**, antes de tudo amiga, a quem tanto admiro, a quem tanto devo, a quem tanto agradeço.

Às Dras. **Roseli Saraiva Moreira Bittar** e **Maria Cecília Lorenzi**, com quem sempre pude contar e muito nos ensinou.

Ao **Dr. Ítalo Roberto Torres de Medeiros**, amigo e padrinho, sempre presente nas horas de alegria, jamais ausente nas horas difíceis.

À Dra. **Sulene Pirana**, pelos primeiros conhecimentos e colocações no início deste estudo.

À **Elaine Pires Leon, Cleonice Bueno, Francisca V. de Souza, Eliane M. Marcelino de Lima, Margarete B. G. Vendramini, Virgínia L. N. Bonoldi, Vilma A. M. Ferreira, Juraci Pereira, Angela M. de Souza e Maria Aparecida A. Ferraz** do Laboratório de Investigação Médica (LIM 17) da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, que me receberam com carinho e que sempre se colocaram à disposição para tudo que eu precisasse.

Às secretárias **Márcia, Marilede, Bárbara, Luci, Edzira, Lúcia e Ofélia**, que gentilmente nos deram apoio nas tarefas mais árduas.

Aos funcionários da Enfermaria e do Ambulatório de Otorrinolaringologia, em especial à **Meire, Mariza, Claudecy, Rita, Marcos, Paulo, Cida, Cidinha e Rosângela**, que sempre nos auxiliaram a cada momento desta caminhada.

Ao **Claudinho e Santana**, da Disciplina de Técnica Cirúrgica, que sempre estiveram à disposição para dissecação de osso temporal canino.

À **CNPq** pelo apoio à pesquisa e por tornar este estudo possível.

Àos **residentes** e à **todos** que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui...

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	i
Lista de siglas	iii
Artigos para serem publicados	iv
Resumo.....	xxxviii
Summary	xxxix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	8
1. Aspectos clínicos da surdez neurosensorial imunomediada.....	9
2. A imunopatologia da orelha interna.....	11
3. Métodos diagnósticos na surdez neurosensorial imunomediada.....	14
OBJETIVOS	18
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
1. Casuística.....	21
2. Métodos.....	25
RESULTADOS	39
1. Análise dos dados clínicos e demográficos	40
2. Avaliação do perfil imunológico pelos testes inespecíficos.....	44
3. Análise dos auto-anticorpos séricos	46
4. Detecção de anticorpos contra células HeLa pelo <i>Western blot</i>	47
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES.....	67
ANEXOS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA	Anticorpo anticardiolipina
ANA	Anticorpo antinúcleo
ANOVA	Análise de variância
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA de dupla hélice (DNA nativo)
C3	Fração C3 do complemento
C4	Fração C4 do complemento
CH100	Complemento total hemolítico
CO ₂	Dióxido de carbono
Crio	Crioglobulina
DP	Desvio padrão
FR	Fator reumatóide
Gc	Grupo controle
Ge	Grupo de estudo
HCFMUSP	Hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de São Paulo
<i>hsp</i>	<i>Heat shock protein</i>
IC	Imunocomplexos circulantes
IgA	Imunoglobulina de cadeia pesada tipo α
IgG	Imunoglobulina de cadeia pesada tipo γ

IgM	Imunoglobulina de cadeia pesada tipo μ
LIM	Laboratório de Investigação Médica
M	Doença de Ménière
NA	Nível de audição
OPD	Diamina ortofenileno
PBS	Solução salina em tampão fosfato
PBS-SFB	PBS com soro fetal bovino
PBS-T	PBS com Tween 20
PCR	Proteína C-reativa
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PMSF	<i>Phenylmethyl sulfonyl fluoride</i>
PTA	<i>Pure tone average</i>
RP	Surdez rapidamente progressiva
r.p.m.	rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNIM	Surdez neurosensorial imunomediada
SS	Surdez súbita
VHS	Velocidade de hemossedimentação
WB	<i>Western blot</i>

LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
dB	Decibel
Hz	Hertz
kD	Quilodalton
kHZ	Quilohertz
M	Molar
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
seg	Segundos
U	Unidades
UI	Unidades internacionais

ARTIGOS PARA SEREM PUBLICADOS

Autoantibody Profile in Sensorineural Hearing Loss: A New Finding

Kii, Marcia Akemi, MD[‡];

Viana, VST, PhD[§];

Sanchez, TG, MD, PhD[‡];

Bonfá, E, MD, PhD[§];

‡ Division of Otolaryngology, Medical School, University of São Paulo

§ Division of Rheumatology, Medical School, University of São Paulo, SP.

São Paulo - Brazil

*** Research supported in part by CNPq**

Corresponding author: Márcia Akemi Kii, MD

Department of Otolaryngology

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255- 6º andar, sala 6167 - 05403-000

São Paulo, SP - Brazil

Phone: 55-11-3069.6288 Fax: 55-11-3088.0299

e-mail: márcia.kii@ig.com.br

ABSTRACT

Objectives. Immune-mediated sensorineural hearing loss (SNHL) is one of few forms of reversible SNHL, justifying the need to define more specific markers to help clinical approach. Western blot with bovine tissues detect an autoantibody against the 68kD protein (hsp70) in immune-mediated SNHL. However, anti-hsp70 antibodies are also common in healthy individuals. The objective of this study was to determinate the reactivity of serum from patients with otologic entities often related to autoimmune etiology against human cell line antigen (HeLa) by Western blot, comparing to other serological markers.

Methods. Sera of 81 patients with SNHL (25 sudden SNHL, 35 rapidly progressive SNHL and 21 Ménière's disease patients) were tested by Western blot using HeLa cell total extract as target. Western blot outcome was compared with detection of other current autoimmune markers. Experimental group data were compared to normal-hearing subjects ($n=48$) without otologic or systemic autoimmune disease.

Results. Reactivity to HeLa cells was observed mostly at 42, 48 and 62kD region which pattern was different among different groups. Strong binding to 48 and 62kD HeLa cell antigen was observed in sudden SNHL and rapidly progressive SNHL. The 48kD protein from rapidly progressive SNHL seems to be different from sudden SNHL's according to trypsin treatment.

Conclusions. This study detected autoreactivity to HeLa cells in sudden SNHL, rapidly progressive SNHL and Ménière's disease, suggesting the presence of new autoantibodies. Their role is still unknown and further studies should evaluate their relevance on pathology in the inner ear or as diagnostic or prognostic marker.

Key Words: sensorineural hearing loss; sudden hearing loss; rapidly progressive hearing loss; Ménière's disease; immune-mediated; autoimmune; autoantibody.

INTRODUCTION

Sensorineural hearing loss (SNHL) is a common and substantial problem in otology that can result in severe disability. Although many clinical and experimental studies have been developed in the last decades, its pathophysiology is not fully understood¹.

The immune-mediated SNHL is one of few forms of reversible SNHL². Due to this fact, it has gained more and more attention from researchers in the last few years. It can result from a specific inner ear injury or can be related to other systemic autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, Cogan's syndrome, polyarthritis nodosus, and systemic lupus erythematosus. These conditions are associated with circulating immune complexes that produce multiple tissue lesions by their disposition, complement fixation and activation of inflammatory mediators. The SNHL can be the sole manifestation of an autoimmune disorder in 60 to 65%³.

The reversibility of immune-mediated SNHL can be seen in patients who promptly receive immunosuppressive therapy and present recovery of hearing ability or halt of the progression of the disease^{4,5}. In this concept, there is an increasing need for a highly specific diagnostic test to allow the identification of patients who can be successfully treated with immunosuppressive drugs, thereby avoiding risks of serious and unnecessary side effects.

Since first description in 1979 by McCabe², attempts to find a specific diagnostic marker for immune-mediated inner ear disease have been promising. Recently, the Western blot (WB) with bovine inner ear extracts (in substitution of human inner ear extract) has been used since the description of an autoantibody against an antigen in the 68kD region in 35% of immune-mediated progressive SNHL⁶. The positive test to anti-68kD is predictive of favorable response in corticosteroid treatment⁵. However, this protein is related to a heat-shock protein (hsp-70)³. The heat-shock protein families are usually associated to autoimmune conditions, but also can be present in other situations, being induced by different stressors (heat, nutrient deprivation, low pH, anoxia, exposure to toxins). In addition, anti-hsp70 antibodies are also common in healthy individuals^{7,8}. Because of the wide degree of overlap in reactivity among healthy and non healthy, the measurement of autoantibodies against heat shock proteins has no utility for the diagnosis^{7,8}. This verification makes questionable the validity of the anti-68kD determination test. In addition, non human tissue has been used as a target in Western blot test which may change specificity of the test.

HeLa cell is a well-established epithelial cell line isolated from human adenocarcinoma of cervix of uterus and cultured to create a cell line for medical research. Since then, it has been used in a large number of medical experiments contributing to understand pathophysiology, cellular signal transduction and genetic patterns. It can also be used in diagnostic protocols

as human target antigen (determination of antinuclear autoantibody by immunofluorescence, for example).

The rapidly progressive hearing loss, sudden SNHL and Ménière's disease are entities often related to immuno-mediated etiology^{3,6,9}. The immune-mediated inner ear disease can be clinically similar to other forms of progressive, sudden or fluctuating hearing loss, and reinforces the necessity of definition of specific markers to help in the diagnosis for an appropriate therapy. Considering otological entities where immune-mediated etiology can be involved, this study was performed to determinate reactivity of serum of patients with sudden SNHL, rapidly progressive SNHL and Ménière's disease against HeLa - a human cell line - by Western blot assay.

PATIENTS AND METHODS

The protocol was reviewed and approved by the local Research Ethics Committee. All studied subjects provided an informed consent in compliance with requirements of the Committee.

1. Patients

Experimental Group.

Eligible consecutive patients with SNHL were referred to the first author from the Department of Otolaryngology of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (São Paulo, Brazil) between September 2000 and

March 2003. The inclusion criteria for this study were a history of sudden SNHL, rapidly progressive hearing loss or established diagnosis of Ménière's disease, without previous history of systemic autoimmune disease and treatment with oral steroids or other immunosuppressant medications. Noise-induced hearing loss, ototoxicity, presbycusis, central hearing loss, tumors, hereditary and congenital alterations were excluded.

Eighty-one patients (54 female and 27 male; mean age 40.8 ± 14.8 years) with SNHL were enrolled for this study and distributed into three subgroups according to the following diagnosis criteria:

1. **Sudden SNHL:** 25 patients with sudden SNHL defined as a sensorineural hearing loss of 30dB or more over at least three contiguous audiogram frequencies that develops over a period of a few hours to 3 days¹⁰.
2. **Rapidly progressive SNHL:** 35 patients with rapidly progressive SNHL over a period of weeks to months (rapidly progressive SNHL), sometimes fluctuating, affecting one or both sides.
3. **Ménière's disease:** 21 patients with Ménière's disease according to the criteria established by the Committee on Hearing and Equilibrium of the American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery¹¹. These criteria include spontaneous recurrent episodic vertigo lasting at least 20 minutes, hearing loss, tinnitus and aural fullness. The hearing loss is of a low-frequency sensorineural type that

becomes flat over time. Hearing fluctuation is not considered essential to the diagnosis.

Control Group.

Another group was composed with 48 normal-hearing subjects from Medical Investigation Laboratory (LIM 17) personnel at Division of Rheumatology, with no otologic complaint or autoimmune disorders.

2. Clinic and Audiologic Evaluation

All subjects answered to a questionnaire and underwent physical examination by the same physician following a standard protocol. The questionnaire included records on demographic data, affected ear, and presence of vertigo, tinnitus, aural fullness and fluctuation. Audiometric tests were performed at the initial consultation. Audiometric outcome was assessed by calculating the four pure tone average (PTA) of 0.5, 1, 2 and 3 kHz¹². PTA normal range was defined by values up to 25dB. SNHL was classified as mild (PTA 25 to 40dB HL), moderate (PTA 41 to 70dB HL), severe (PTA 71 to 90dB HL) and profound (PTA >90dB HL).

3. Laboratory evaluation

Detection and analysis of autoantibodies profile was carried out at the Medical Investigation Laboratory Division of Rheumatology and at Central Laboratory of Hospital das Clínicas, School of Medicine, University of São Paulo. Serum samples were collected from each subject and stored by the same laboratory worker at 4°C for prompt testing or at -20°C for storage and later usage.

Immunologic profile. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by automatic Westergren method. Determination of C-reactive protein (CRP) level was made by nephelometry. Immunoglobulin subclasses levels were measured by immunoturbidimetric method (IgG, IgM and IgA). Total hemolytic complement (CH100) and circulating immune complexes (IC) were measured, respectively, by immunohemolysis test and by a capture ELISA using rabbit anti-human C1q antibody. Normal values were 150-350 U/ml for CH100, and levels up to 35µg/ml for IC. Determinations of C3 and C4 levels were performed by radial immunodiffusion using commercial available complement detecting plates (Behring-Werke AG, Marburg Germany). Crio globulins were detected by keeping 2ml serum samples with sodium azide as preservative at 4°C for 2-3 days. Antibody anti-*Borrelia Burgdorferi* (Lyme disease) was assayed by ELISA. Serum samples diluted 1:100 and 1:400 were used for detection of anti-*B.Burgdorferi* IgM and IgG subclasses, respectively.

Screening for autoantibodies commonly found in systemic rheumatic autoimmune diseases.

This included evaluation of antinuclear autoantibodies (ANA), anti-dsDNA, anti-phospholipid antibodies (anti-cardiolipin), and rheumatoid factor (FR). All sera were screened for the presence of autoantibodies to nuclear (ANA) and cytoplasmic components by indirect immunofluorescence on a human cell line, HEp-2 cells isolated from epidermoid carcinoma from larynx (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Presence of circulating anti-dsDNA antibodies was analyzed by immunofluorescence on *Crithidia luciliae*. Antibodies to the phospholipid cardiolipin both IgG and IgM isotypes were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available antigens (Sigma Chem. Co., USA)¹⁴. Presence of rheumatoid factor in serum was evaluated by latex agglutination test.

4. Autoantibody analysis by Western blot.

Detection of autoantibody against HeLa cell extract was performed by Western blot as follows:

Antigen preparation. Characterization of target cellular antigens was performed by immunoblotting using crude saline extract of HeLa cell, a well-established epithelial cell line isolated from human adenocarcinoma of the cervix (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). HeLa cells were cultivated under standard conditions, in 199 medium (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Confluent monolayers were rinsed with cold

phosphate-buffered saline (PBS), briefly trypsinized, and detached from the plastic surface through a cell-scraper. After extensive washing with cold PBS, HeLa cells were recovered by centrifugation and resuspended in PBS containing 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) as a protease inhibitor. A total cell extract was obtained by three freeze-thawing cycles, followed by sonication at 35kHz/20s. Protein content was determined by the method of Lowry⁴.

SDS-PAGE and Immunoblotting. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli¹⁵. HeLa total cell extracts (100µg of protein/slot) were submitted to SDS-PAGE on 10% acrylamide running gel and 3% stacking gel. Molecular weights were included in each gel to determine the molecular mass of protein fractions recognized by serum sample (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). The proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes in the TRIS-glycine buffer without SDS, for 2 hours according to Towbin¹⁶, under constant voltage. The nitrocellulose strips were blocked with 5% nonfat dry milk powder in TRIS-buffered saline (TBS), pH 7.4 for 2 hours before they were incubated for 90 minutes at room temperature with serum sample diluted 1:20 in TBS 1x, containing 1% skinny dry milk with 10% inactivated adult bovine serum and 0.1% Tween-20 (TBS-Tween 20). After blots rinsed with TBS-Tween-20, the cellulose membrane was incubated with secondary antibody, a IgG fraction from goat antihuman IgG alkaline phosphatase-conjugate (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), at a

1:3000 dilution in TBS-MBST for 1 hour at room temperature. Then, the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Human sera positive for well-known autoantibodies of systemic rheumatic autoimmune diseases as well as normal human sera were systematically included in each assay as controls.

Characterization of target antigen. To determine the nature of target molecules, HeLa total cell extract was treated with trypsin (1:10 enzyme-substrate ratio) prior to SDS-PAGE electrophoresis. Similarly, the relevance of carbohydrate moiety of antigen molecule on antibody binding was investigated by pretreating nitrocellulose strips containing electrophoretically separated HeLa total cell proteins with 0,15M or 0,3M sodium metaperiodate before testing serum reactivity.

Statistical Analysis

Statistical analysis included t-student test and ANOVA for quantitative variables, as well as chi-square, Fisher's and Likelihood ratio tests for categorical variables. Univariate logistic regression was also employed. Two-tailed test values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant for all comparisons. The SPSS software package was used for all statistical analysis (version 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

1. Demographic and clinical characterization.

The gender distribution was not homogeneous among three SNHL subgroups ($p=0.008$). The majority of patients with Ménière's disease was female (85.7%; $p=0.038$) what did not occur in the control (normal-hearing) group. The rapidly progressive and sudden SHNL were not different from this control group in gender analysis.

The mean age of experimental and control groups was respectively 40.8 ± 14.8 years and 36.8 ± 10.9 years. The three SNHL subgroups had similar mean age ($p=0.261$), although the rapidly progressive SNHL patients were significantly different from the normal-hearing individuals ($p=0.043$). (TABLE I).

Unilateral disease was observed in almost half of all 81 SNHL patients (54%). The highest incidence of unilateral ear involvement was found in patients with sudden SNHL (84%) followed by rapidly progressive SHNL (43%) and Ménière's disease subgroups (38%).

Tinnitus was the most frequent associated symptom (66.7%), followed by vertigo (46.9%), fluctuating (27.2%) and aural fullness (19.8%). The three last symptoms were more frequent in Ménière's disease subgroup.

The four pure tone average analysis of 81 audiometric tests from SNHL patients showed the PTA mean value around 57 ± 21.2 dB HL. The moderate SNHL were commonly found in all subgroups (51.4% in rapidly

progressive and 40% in sudden SNHL), except in Ménière's disease patients who mainly showed a mild SNHL (48%).

2. Laboratory evaluation

Immunological profile. The rapidly progressive SNHL had IgG (34.3%; $p=0.044$), ESR (31.4%; $p=0.022$) and C4 determination (11.4%; $p=0.034$) significantly different from other SNHL subgroups. In contrast, the anti-*Borrelia Burgdorferi* antibody was more frequent in Ménière subgroup (23.8%; $p=0.049$)(TABLE II). The other tests did not show differences among three subgroups. The normal-hearing group did not show any alteration in all these tests.

Screening for autoantibodies commonly found in systemic rheumatic autoimmune diseases. Five (6.2%) patients sera were positive for antinuclear autoantibodies and 1 (1.2%) for rheumatoid factor. Additionally, other autoantibodies observed in autoimmune rheumatic diseases, such as anti-phospholipid (cardiolipin) and anti-dsDNA were consistently undetectable in these sera.

3. Autoantibody analysis by Western blot. WB analysis showed a positive reactivity against HeLa cell extracts. Target molecule of 32, 38, 42, 48, 52, 58, 62 and 66kD molecular weight were detected. Each subgroups with sudden SNHL, rapidly progressive SNHL and Ménière patients was compared to the control individuals for identification of more representative

band. The 38, 58, and 66kD were not considered because of their presence in the control group.

Detection and characterization of autoantibodies to HeLa cell antigens in sudden SNHL. Strong reactivity to HeLa cell antigens of 48kD and 62kD was observed in 40% and 36%, respectively of sera from patients with sudden SHNL (FIGURE 1, lanes a, b). Furthermore, 12% (3/25) of patients' sera recognized both cell antigens. Compared to the control subjects, sudden SNHL subgroup showed statistically difference on the presence of autoantibodies to 48 and 62kD antigens ($p=0.003$ and $p<0.001$, respectively).

Binding to a 38kD HeLa cell antigen was observed in 20% of patients. However, this reactivity was also observed in normal sera ($p=0.494$).

Characterization of 48 and 62kD target antigens showed that both are proteins since trypsin digestion of HeLa cells extracts prior to incubation with sera totally abolished the antibody binding. In addition, epitope may not have carbohydrate moiety since pretreatment of these antigens with 0.15 and 0.3M sodium metaperiodate did not interfere with antibody binding.

Detection and characterization of autoantibodies to HeLa cell antigens in rapidly progressive SNHL. Four major HeLa antigens with 32, 42, 48 and 62kD were recognized in rapidly progressive SHNL. Reactivity to 48kD was the most frequent, detected in 37.1% ($p=0.002$) of rapidly progressive SHNL patients followed by the anti-62kD (25.7%; $p=0.001$) and anti-42kD in 20% ($p=0.032$). The 32kD antigen was recognized in 11.4%

($p=0.028$). There was an association between the anti-48kD and anti-62kD reactivity since 11.4% (4/35) of patients recognized both antigens.

Reactivity to 32, 42 and 62kD antigens was completely abolished after enzymatic treatment of HeLa extract, demonstrating their protein nature (Figure 2, lane 1). Interestingly, antigen of 48kD recognized by rapidly progressive SHNL sera exhibited a peculiar characteristic of marked trypsin resistance (Figure 2. lane 2). Although having the same molecular weight, antigens of 48kD from sudden SNHL subgroup are different from the rapidly progressive SNHL subgroup. Exposition to sodium metaperiodate did not change antibody binding to any of these proteins.

Detection and characterization of autoantibodies to HeLa cell antigens in Ménière's disease. Sera from patients with Ménière's subgroup showed a scarce reactivity against HeLa cell antigens as compared with sudden and rapidly progressive SHNL patients. Binding was heterogeneous with no remarkable target, except for anti-42kD, which was recognized in 38.1% ($p=0.001$) (FIGURE 3 lane1).

The characterization of all target antigens in the Ménière subgroup was similar to sudden SNHL subgroup. Trypsin treatment abolished the antibody binding and pretreatment of sodium metaperiodate did not interfere with antibody binding.

DISCUSSION

Demographic and Clinical characterization. The clinical findings of immune-mediated SNHL described initially by McCabe included a bilateral, although asymmetric, progressive SNHL with a period of progression over weeks or months². Hughes reported autoimmune reactivity in Ménière's disease and in Cogan's syndrome and included not only bilateral but also unilateral affection¹⁷. In the present study 43% of patients with progressive hearing loss and 84% had unilateral disease. From these, some patients had a favorable response to prednisone, suggesting that immune mediated etiology may be associated even in unilateral cases. Some authors found raised circulating immune complexes (IC) even in unilateral Ménière's disease¹⁸. Others did not find significant difference between unilateral or bilateral cases. In addition, symptoms may also present as sudden SNHL or have insidious course over many years¹⁹ from one side to the other, justifying the inclusion of unilateral cases. As seen, clinical criteria are conflicting and laboratorial tests may help in this concern as well as the immunosuppressive therapy response.

The different age and sex distribution in some studied subgroup and restricted number of sample can be a limitation in our statistical analysis.

Laboratory evaluation. Circulating immune complexes were detected^{18,20} in steroid responsive SNHL and Ménière's disease. No relationship between IC and inner ear disease activity was found¹⁸. In this study, 10 patients who

had IC alterations did not show relationship with WB reactivity. The involvement of IC in immune-mediated SNHL pathology is unclear.

Regarding the humoral immunity, several tests are available to screen inner ear specific or nonspecific autoantibodies. The indirect immunofluorescence method has been used on several cell lines, including vascular endothelium, sarcolemma, human temporal bones. Increased incidence of nonspecific autoantibodies (directed against various tissue elements but not for inner ear) is referred in Ménière's disease¹⁸. Some authors recognized specific reaction to inner ear in 18%^{5,6}. In this study, the reactivity to inner ear nonspecific autoantibodies (including ANA, RF, anti-dsDNA, anti-phospholipid antibodies) commonly found in rheumatic diseases and other inflammatory tests (ESR, CPR, Ig concentration, C3, C4, CH100, IC) were mostly infrequent, without a special pattern of apparition. However, in rapidly progressive SNHL patients significant alterations in IgG, ESR and C4 levels were seen. Other alterations were showed in rapidly progressive SNHL but without statistical significance (IgM level, CPR, IC, ANA). Some patients remain in evaluation at the Rheumatology Department due to supposed systemic autoimmune disease. One diagnosis was rheumatoid arthritis, other miastenia gravis and 3 developed with autoimmune hypothyroidism.

In another study, 16 patients who had corticosteroid indication, almost all the inflammatory and inner ear nonspecific test were negative. In spite of this, 13 had good response to corticosteroids administration, showing that

immune etiology could be associated and appropriate therapy should be tried even if inflammatory tests are negative

Autoantibody analysis by Western blot. The present study describes an autoantibody in sera of three otological entities where the autoimmune or immune mediated etiology can be involved. This is the first time to demonstrate reactivity of sudden SNHL, rapidly progressive SNHL and Ménière's disease patients' sera against HeLa cells in the Western Blot (WB). The HeLa cells, a human epithelial cell line derivated from cervix adenocarcinoma have been used for a long time in immunology laboratories for routine exams (for screening anti-P autoantibody, for example), but never had been used for testing SNHL sera.

Autoimmune disease is defined as the pathologic sequel of an autoimmune response. Autoimmunity is a condition illustrated by the presence of self-reactive antibodies or T-cells⁸. Autoantibodies are relatively common in humans without autoimmune disease as a result of physiological mechanisms. Such autoantibodies present in low titer without appropriate clinical evidence, is rarely the basis for diagnosis. Most autoantibodies may not even contribute directly to disease, but may be valuable as markers in the prognosis or disease activity. The identification of the autoantibody to HeLa cells does not substantiate the pathophysiology, but can be a biomarker. More studies are necessary to evaluate this possibility.

In a pilot study, HeLa cells were heated (in 42,5°C, for 3 hours) to induce heat-shock proteins. The WB was performed on pre-heated HeLa cells

testing the same patient's sera, in the same conditions and dilution. The reactivity to heated HeLa cells was not observed, suggesting that autoantibody is not a heat shock protein.

The different response to trypsin treatment demonstrates that the autoantibody detected in sudden SNHL and Ménière's disease can be different from the autoantibody of rapidly progressive SNHL. In other point, the pattern of reactivity is different from one disease to others.

The real usefulness of reactivity against HeLa cells is unknown. Further characterization of the antigen is necessary. Other studies comparing corticosteroid response, clinical evolution and reactivity to HeLa cells must be done to verify the relationship from this reactivity and immune-mediated inner ear disease.

CONCLUSIONS

This study detected autoreactivity to HeLa cells in patients with sudden SNHL, rapidly progressive SNHL and Ménière's disease, suggesting the presence of new autoantibodies. The role of these autoantibodies is unknown and further studies are necessary to evaluate its relevance on pathology in the inner ear or as diagnostic or prognostic marker.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are indebted to the staff of the Division of Rheumatology and Otolaryngology from Medical School of University of São Paulo.

REFERENCES

1. Gloddek B, Arnold G. Clinical and experimental studies of autoimmune inner ear disease. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2002;548:10-14.
2. McCabe BF. Auto-immune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1979;88:585-9.
3. Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:181-8.
4. Moskowitz D, Lee KJ, Smith HW. Steroid use in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope.* 1984; 94:664-6.
5. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JBJr, Block KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. *JAMA.* 1994;272(8):611-6.
6. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;100:516-524.
7. Samuelsson AK, Hydén D, Roberg M, Skogh T. Evaluation of anti-hsp70 antibody screening in sudden deafness. *Ear Hear.* 2003;24:233-235.
8. Peter JB, Shoenfeld Y. *Autoantibodies.* Amsterdam:Elsevier Science B. V.; 1996.

9. Tomiyama S, Harris JP. The endolymphatic sac: its importance in inner ear immune response. *Laryngoscope*. 1986;96:685-91.
10. Friedmann I, Arnold W. *Pathology of the ear*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.
11. Committee on hearing and equilibrium of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, INC. Committee on hearing and equilibrium guidelines for diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;113(13):181-185.
12. Monsell EM. New and revised reporting guidelines from the committee on hearing and equilibrium. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;113:176-8.
13. Grodzicki RL, Steere AC. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigens preparations for diagnosis of early Lyme disease. *J Infect Dis*. 1988;157:790-97.
14. Gharafi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987; 46:1-6.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4356.
17. Hughes GB, Kinney SE, Barna BP, Calabrese LH. Autoimmune reactivity in Ménière disease: a preliminary report. *Laryngoscope*, 1983; 93(4):410-417.

18. Brookes GB. Circulating immune complexes in Ménière's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986, 112:536-540.
19. Hughes GB, Barna BP, Calabrese LH. Clinical diagnosis of immune inner-ear disease. *Laryngoscope.* 1988; 98:251-253.
20. Garcia Callejo FJ, Marco AJ, Martinez BMP, Orts AMH, Morant VA. Autoimmune identification of sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol.* 2003; 123(2):168-71.

TABLE I.
Age and Sex Distribution in Patients with Sensorineural Hearing Loss

Groups	AGE mean \pm SD	GENDER				Total (<i>n</i>)
		Female		Male		
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
SSNHL	37.4 \pm 12.6	11	44.0	14	56.0	25
RPSNHL	43.7 \pm 17.0	25	71.4	10	28.6	35
MD	40.1 \pm 12.2	18	85.7	3	14.3	21
TOTAL	39.3 \pm 13.6	83	64.3	46	35.7	129

n: number of patients; SSNHL: sudden sensorineural hearing loss; RPSNHL: rapidly progressive sensorineural hearing loss; MD: Ménière's disease

TABLE II.
Laboratory Data from Patients with Sensorineural Hearing Loss

TEST	SUDDEN SNHL (<i>n</i> =25)		RAPIDLY PROGRESSIVE SNHL (<i>n</i> =35)		MÉNIÈRE'S DISEASE (<i>n</i> =21)		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
IgG	2	8.0	12	34.3	5	23.8	0.044
IgA	5	20.0	5	14.3	4	19.0	0.819
IgM	7	28.0	15	42.9	9	42.9	0.437
CRP	4	16.0	8	22.9	2	9.5	0.424
ESR	3	12.0	11	31.4	1	4.8	0.022
Crio	0	0	0	0	0	0	-
C3	0	0	0	0	0	0	-
C4	0	0	4	11.4	0	0	0.034
CH100	0	0	0	0	0	0	-
IC	1	4.0	5	14.3	4	19.0	0.224
ANA	1	4.0	4	11.4	0	0	0.124
ds-DNA	0	0	0	0	0	0	-
ACA	0	0	0	0	0	0	-
RF	0	0	1	2.9	0	0	0.429
Lyme	3	12.0	1	2.9	5	23.8	0.049

Note: *p* value significant ≤ 0.05

SNHL: sensorineural hearing loss; *n*: number of patients; IgG: immunoglobulin G; IgA: immunoglobulin A; IgM: immunoglobulin M; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; Crio: crioglobulin; C3: complement C3; C4: complement C4; CH100: total hemolytic complement; IC: circulating immunocomplexes; ANA: antinuclear antibody; ds-DNA: anti-DNA antibody; ACA: anti-cardiolipin antibody; RF: rheumatoid factor; Lyme: anti-*Borrelia Burgdorferi* antibody.

TABLE III.
Reactivity Profile against HeLa Cells Patients with Sensorineural Hearing Loss

WESTERN BLOT (kD)	SSNHL (n=25)		RPSNHL (n=35)		MD (n=21)		p ⁽¹⁾
	n	%	n	%	n	%	
32	0	0	4	11.4	1	4.8	0.09 9
38	5	20.0	0	0	2	9.5	0.00 9
42	4	16.0	7	20.0	8	38.1	0.19 0
52	3	12.0	0	0	1	4.8	0.06 5
58	2	8.0	6	17.1	5	23.8	0.31 7
62	9	36.0	9	25.7	2	9.5	0.09 2
66	6	24.0	4	11.4	4	19.0	0.42 8
>66	9	36.0	16	45.7	9	42.9	0.74 9

SSNHL: sudden sensorineural hearing loss; RPSNHL: rapidly progressive sensorineural hearing loss; MD: Ménière's disease.

NOTE: autoantibody against 48kD antigen was not compared here because it seems to be different protein from one subgroup to other according to the response to trypsin.

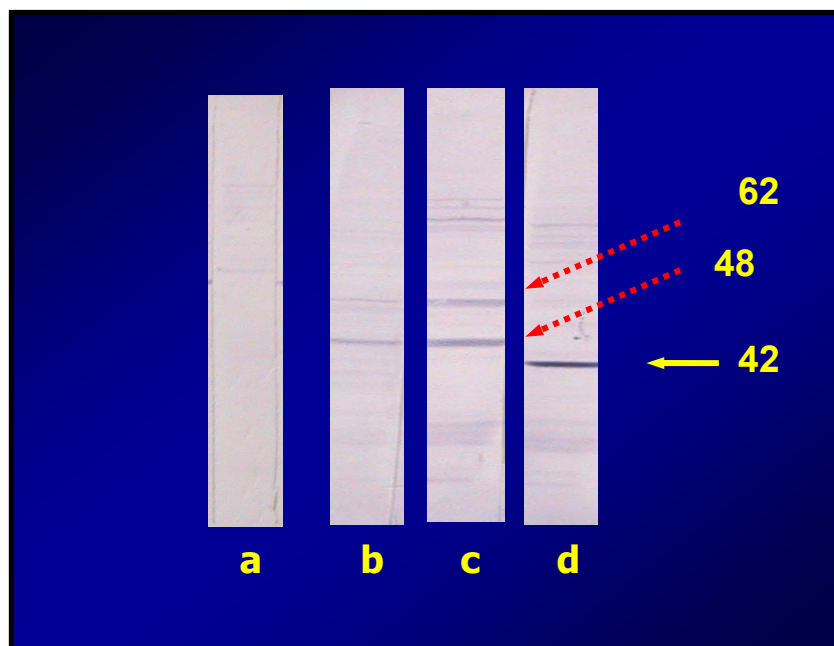


FIGURE 1 – Reactivity of sudden sensorineural hearing loss (b), rapidly progressive sensorineural hearing loss (c), and e Ménière's disease (d) and normal-hearing subject (a) against HeLa cells in *Western blot*. The numbers represent the molecular weight (kD).

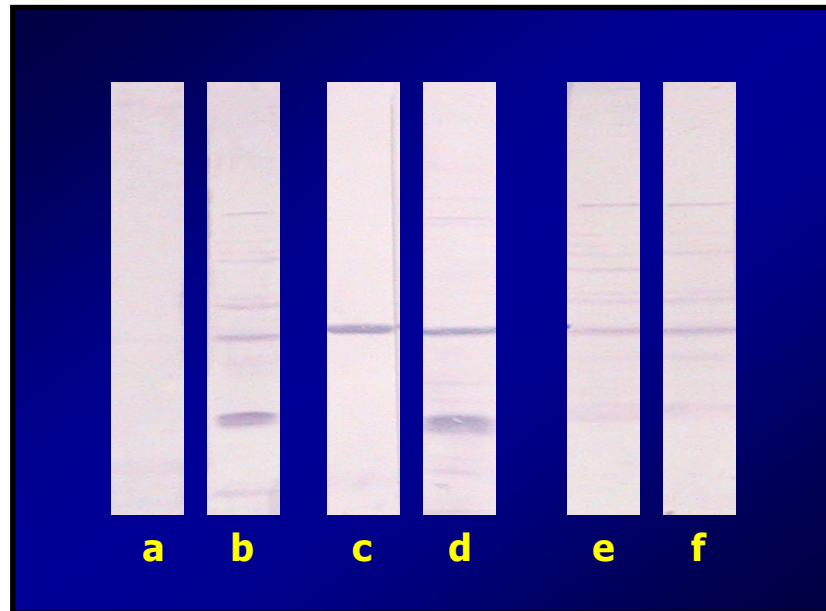


FIGURE 2 – Treatment of HeLa cells extract by trypsin (a, c) e metaperiodate (e). The reactivity in HeLa cells without treatment is represented in b, d, f lines. The sudden sensorineural hearing loss patient's reactivity is showed in a, b lines; The rapidly progressive hearing loss patient's response is showed in c, d, e, f lines. An antigen resistant to trypsin is showed in rapidly progressive sensorineural hearing loss (c), different from the sudden sensorineural hearing loss patient (a). Metaperiodate did not change any reaction.

RESUMO

KII, M.A. *Perfil de auto-anticorpos na surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière*. São Paulo, 2004. 90p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A surdez neurossensorial imunomediada (SNIM) é uma das formas reversíveis de surdez neurossensorial, justificando a necessidade de identificação de marcadores mais específicos que ajudem na sua abordagem. O *Western blot* com antígenos de tecidos bovinos detecta um anticorpo contra a proteína de 68kD (hsp-70) em SNIM. Entretanto, anticorpos anti-hsp-70 são comumente encontrados em indivíduos saudáveis. O objetivo do estudo foi determinar a reatividade de soros de pacientes com doenças otológicas frequentemente relacionadas à etiologia auto-imune contra antígeno celular de linhagem humana (HeLa) através do *Western blot*, comparando com outros marcadores sorológicos de auto-imunidade. Soros de 81 pacientes com surdez neurossensorial (25 surdez súbita, 35 rapidamente progressiva e 21 doença Ménière) foram testados por *Western blot* utilizando extrato total de célula HeLa como antígeno alvo. Os pacientes com surdez foram comparados com indivíduos com audição normal e sem queixas otológicas ou história de doença sistêmica auto-imune ($n=48$). Observou-se reatividade contra célula HeLa principalmente nas regiões de 42, 48 and 62kD no grupo com surdez. O padrão de reatividade foi diferente entre os diferentes subgrupos de surdez. A reatividade contra as bandas de 48 and 62kD foi observada em surdez súbita e surdez rapidamente progressiva. A proteína de 48kD proveniente da surdez rapidamente progressiva parece ser diferente daquela encontrada em surdez súbita devido a sua resistência à tripsina. Este estudo demonstrou a existência de autorreatividade contra células HeLa na surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière, sugerindo a presença de novos auto-anticorpos. O seu papel é ainda desconhecido. Estudos detalhados são necessários para avaliar a real relevância clínica desta autorreatividade na patologia de orelha interna ou como marcador prognóstico ou diagnóstico.

SUMMARY

KII, M.A. *Autoantibody profile in sudden sensorineural hearing loss, rapidly progressive hearing loss and Ménière's disease*. São Paulo, 2004. 90p. Thesis (Doctorate) – School of Medicine, University of São Paulo.

Immune-mediated sensorineural hearing loss (SNHL) is one of few forms of reversible SNHL, justifying the need to define more specific markers to help clinical approach. Western blot with bovine tissues detect an autoantibody against the 68kD protein (hsp70) in immune-mediated SNHL. However, anti-hsp70 antibodies are also common in healthy individuals. The objective of this study was to determinate the reactivity of serum from patients with otologic entities often related to autoimmune etiology against human cell line antigen (HeLa) by Western blot, comparing to other serological markers. Sera of 81 patients with SNHL (25 sudden SNHL, 35 rapidly progressive SNHL and 21 Ménière's disease patients) were tested by Western blot using HeLa cell total extract as target. Western blot outcome was compared with detection of other current autoimmune markers. Experimental group data were compared to normal-hearing subjects ($n=48$) without otologic or systemic autoimmune disease. Reactivity to HeLa cells was observed mostly at 42, 48 and 62kD region which pattern was different among different groups. Binding to 48 and 62kD HeLa cell antigen was observed in sudden SNHL and rapidly progressive SNHL. The 48kD protein from rapidly progressive SNHL seems to be different from sudden SNHL's according to resistance to trypsin. This study detected autoreactivity to HeLa cells in sudden SNHL, rapidly progressive SNHL and Ménière's disease, suggesting the presence of new autoantibodies. Their role is still unknown and further studies should evaluate their relevance on pathology in the inner ear or as diagnostic or prognostic marker.

INTRODUÇÃO

A surdez neurossensorial é um problema comum dentro da Otologia que pode levar a conseqüências sociais, econômicas e diminuição da qualidade de vida. Entretanto, ainda que estudada vastamente, a sua etiopatogenia não é bem estabelecida em muitos casos, sendo classificada como idiopática (GLODDEK; ARNOLD,2002).

A surdez neurossensorial pode ser manifestação inicial de uma doença sistêmica auto-imune (MCCABE, 1979) ou ainda, ser a única manifestação de doença auto-imune em cerca de 60 a 65% dos casos (BILLINGS et al., 1995).

Neste contexto, a surdez neurossensorial imunomediada (SNIM) é reconhecida como uma das possíveis causas para a disfunção progressiva do sistema cocleovestibular (LEHNHARDT, 1958; MCCABE; 1979; HARRIS, 1984; RAHMAN et al., 2001), constituindo uma das poucas formas de surdez neurossensorial com possibilidade de reversão do quadro auditivo.

Quanto à fisiopatologia, a SNIM pode ser resultado de um comprometimento órgão-específico onde anticorpos são dirigidos contra um único órgão-alvo (no caso, a orelha interna) ou ser decorrente de doença sistêmica auto-imune (doença não órgão-específica) como a artrite reumatóide, poliarterite nodosa, lúpus eritematoso sistêmico, policondrite recidivante, colite ulcerativa, granulomatose de Wegener e síndrome de Cogan, produzindo sintomas auditivos e vestibulares em decorrência de vasculites (MCCABE, 1979; HUGHES et al., 1984; SCHUKNECH; NADOL 1994; HARRIS; RYAN, 1995; ALVARENGA et al., 1999). A deposição de imunocomplexos circulantes, ativação e fixação de complemento, liberação de mediadores inflamatórios e infiltração de células inflamatórias também podem estar envolvidas no mecanismo de lesão tecidual da orelha interna.

Descrita por McCabe em 1979 como entidade clínica distinta, a SNIM foi definida inicialmente como surdez rapidamente progressiva, caracterizada por perda auditiva neurossensorial com progressão em semanas a meses, em geral bilateral, assimétrica, sem sintomas vestibulares importantes, que responde ao tratamento com corticosteróides.

Atualmente, a etiologia auto-imune também tem sido relacionada a outras entidades clínicas como surdez súbita e doença de Ménière (HUGHES et al., 1983; HARRIS, 1984; TOMIYAMA; HARRIS, 1986; HUGHES et al., 1988a; HUGHES et al., 1988b; GLODDEK; HARRIS, 1989; RAUCH et al.,

1995). A utilização de corticosteróides tem se mostrado eficaz no tratamento de pacientes com surdez súbita, sugerindo a participação de um processo imunomediado na sua patogênese (RAUCH, 1997; CAMPBELL, 2000). Por outro lado, o quadro inicial pode simular a doença de Ménière. Aproximadamente 30% dos indivíduos com doença de Ménière apresentam etiologia auto-imune (HUGHES; KINNEY, 1983; HUGHES et al., 1988b). Portanto, a SNIM pode se confundir clinicamente com outras formas de surdez neurossensorial progressiva, súbita ou flutuante, fazendo-se mais necessária a definição de marcadores específicos que auxiliem o seu diagnóstico.

A reversibilidade da SNIM é observada em pacientes tratados com drogas imunossupressoras cujo quadro auditivo melhora ou estabiliza após a introdução destas medicações. Isto reforça a necessidade de identificar marcadores específicos para permitir o diagnóstico precoce dos pacientes que se beneficiariam com tratamento imunossupressor, evitando riscos desnecessários e sérios efeitos colaterais (McCABE, 1979).

Na tentativa de auxiliar no diagnóstico da SNIM, são descritos testes inespecíficos para avaliação da atividade inflamatória como: a crioprecipitação quantitativa e qualitativa, o teste da ligação da fração C1q do complemento, dosagem de complemento hemolítico total, velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa, dosagem de imunoglobulinas

séricas e imunocomplexos circulantes (HUGHES, 1984). Quando alterados estes testes sugerem a existência de uma atividade inflamatória sistêmica. Mesmo associados ao teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de auto-anticorpos como o anticorpo antinuclear (ANA), antimitocondrial, antimúsculo liso e anti-DNA, os testes inespecíficos não são importantes para diagnóstico da SNIM (ARNOLD; PFALTZ, 1987).

Devido à dificuldade diagnóstica já mencionada, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar um marcador específico que auxilie no diagnóstico precoce da SNIM. Recentemente, HARRIS e SHARP (1990) observam a presença de um anticorpo contra proteína com peso molecular de 68kD (anti-68kD) em de cerca de 35% dos pacientes com SNIM utilizando o *Western blot* com extratos de tecido bovino como antígeno-alvo. A reatividade contra extrato de orelha interna de cadáver fresco humano é equivalente à do extrato bovino, sendo este último padronizado para a pesquisa do anti-68kD, devido à facilidade de obtenção (HARRIS; SHARP, 1990). A reatividade ao anti-68kD no *Western Blot* está associada à boa resposta ao tratamento com corticosteróides em cerca de 75% dos casos (MOSCICKI et al., 1994; HIROSE et al., 1999), sugerindo-se um valor prognóstico para este teste (SILVA, 2000).

Entretanto, demonstra-se que a proteína anti-68kD é uma *heat-shock protein* (hsp-70) (RAUCH, 1997). As proteínas “de estresse” ou *heat-shock protein* (*hsp*) são comumente relacionadas a autoimunidade, particularmente aquelas da família hsp 60 (WINFIELD; JARJOUR, 1991a), mas também são freqüentemente encontradas em outras circunstâncias, podendo ser induzidas por diferentes situações de estresse como aquecimento, desnutrição, alterações do pH, anóxia, exposição a toxinas e ruído. Além disso, o anticorpo anti-hsp 70 é encontrado fisiologicamente em indivíduos saudáveis. As *hsp* participam do processo de renaturação de proteínas celulares, promovendo a estabilização das mesmas quando expostas a condições adversas, revertendo a desnaturação protéica. Devido ao grau de positividade nos indivíduos saudáveis, tem-se questionado a utilidade da pesquisa de auto-anticorpos contra *hsp* para fins diagnósticos (ROWLEY; KARAPOULOS, 1996; SAMUELSSON et al., 2003).

Com relação aos antígenos empregados, a orelha interna de cadáveres humanos foi utilizada em estudos imunohistoquímicos (VIADA et al., 1993) e em *Western blot* (MOSCICKI et al., 1994), porém com restrições devido à dificuldade de obtenção do extrato. Com maior freqüência, o extrato de orelha e rim bovino vem sendo empregado pela maioria dos autores, através do *Western blot*, para pesquisa do anticorpo anti-68kD na SNIM (HARRIS; SHARP, 1990; MOSCICKI et al., 1994, BILLINGS et al., 1995; GARCIA BERROCAL et al., 2002). É de grande interesse que sejam

identificadas linhas celulares, de linhagem humana, de preferência, de fácil acesso, que auxiliem nos testes diagnósticos para SNIM. Com estes objetivos, a célula HeLa poderia ser considerada uma ótima candidata.

A célula HeLa é uma célula humana, de linhagem epitelial, derivada de adenocarcinoma de colo uterino, isolada e colocada em cultura para pesquisas científicas. Seu nome é derivado de Henrietta Lacks, sua doadora, falecida em 1951. Desde sua morte, suas células foram imortalizadas e têm sido utilizadas em diversas linhas de pesquisa, contribuindo no entendimento da fisiopatologia, genética, imunologia, microbiologia, farmacologia entre outras. São freqüentemente usadas como modelo celular nas pesquisas para testes *in vitro* de drogas antineoplásicas. Pode ser também utilizada como antígeno em protocolos para testes diagnósticos. Em otorrinolaringologia, a célula HeLa vem sendo utilizada no estudo da conexina-26, gene presente na cóclea, cuja mutação é responsável por 50% dos casos de surdez não-sindrômica autossômica recessiva (ESTIVILL et al., 1998; TEKIN et al., 2001; CHANG et al., 2003; RAMSHANKAR et al., 2003).

Não encontramos em revisão de literatura estudos que demonstrem a reatividade de soros de pacientes com suspeita de SNIM contra antígenos de células HeLa através do *Western blot*. Nossa principal hipótese foi a de que os soros de pacientes com suspeita de surdez imunomediada apresentem auto-anticorpos contra uma célula de linhagem humana.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Aspectos clínicos da surdez neurosensorial imunomediada

LEHNHARDT em 1958 é o primeiro a sugerir que a disacusia bilateral assíncrona, onde uma orelha é comprometida antes da outra, pode ser resultado de reações auto-imunes contra proteínas da orelha interna. Somente duas décadas depois, McCabe (1979) descreve a "surdez neurosensorial auto-imune" como uma entidade clínica caracterizada por disacusia neurosensorial progressiva, com evolução de semanas a meses, bilateral, que melhora após tratamento com corticosteróide.

Segundo HUGHES et al. (1984), a etiologia auto-imune deve ser suspeitada sempre que o quadro for bilateral, principalmente se relacionado a hidropisia endolinfática; se houverem doenças auto-imunes sistêmicas relacionadas; se o quadro melhorar com corticoterapia e se testes imunológicos inespecíficos como a dosagem sérica de crioglobulinas, dosagem de complemento e velocidade de hemossedimentação estiverem alterados.

Para HORMAZÁBAL (1986), a doença auto-imune de orelha interna é inicialmente unilateral, mas no decorrer do tempo, pode tornar-se bilateral. Isto é devido à agressão assimétrica das orelhas. Ocorre comprometimento assimétrico e assíncrono das orelhas, com diferença de semanas a meses de um lado para outro, porém este intervalo pode ser até de anos (STONE; FRANCIS, 2000).

Em 1991, HARRIS descreve que pacientes com surdez neurossensorial rapidamente progressiva iniciam o quadro com flutuação da audição, evoluindo progressivamente para disacusia de grau profundo.

MCCABE (1979) e HORMAZÁBAL (1986) propõem a SNIM como manifestação inicial de uma doença auto-imune sistêmica. Muitos associam a SNIM a doenças sistêmicas auto-ímmunes, como lúpus eritematoso sistêmico e colite ulcerativa (ARNOLD, 1997). Porém, a prevalência desta associação não é bem definida, variando entre 18 a 30% dos casos (MCCABE, 1979; HARRIS, 1991).

2. A Imunopatologia da orelha interna

2.1. A imunologia

O cérebro e a orelha interna foram considerados no passado como sítios imunoprivilegiados, isolados de resposta imune sistêmica, devido à presença das barreiras hematoencefálica e hematolabiríntica (BARKER; BILLINGHAM, 1977; HUGHES et al., 1984). A barreira hematolabiríntica está relacionada à manutenção do gradiente iônico coclear.

À semelhança do líquido cefalorraquidiano, imunoglobulinas podem ser encontradas na perilinfa na concentração de 1:1000 em relação ao nível sérico (MOGI et al., 1982; HARRIS, 1983; HARRIS; RYAN, 1984).

Respostas imunes celular e humoral são desencadeadas após injeção de antígenos no espaço perilinfático, levando a infiltração celular, inflamação e lesão coclear, com aumento de produção local de anticorpos (HARRIS, 1984; HARRIS et al., 1985). Supõe-se que esta resposta imune dependa da migração de leucócitos através da veia espiral modiolar, com ativação de células endoteliais, levando a expressão de moléculas de adesão e recrutamento de células da circulação (STEARNS et al., 1993; HARRIS; RYAN, 1995; SUZUKI; HARRIS, 1995).

O saco endolinfático exerce importante função na resposta antigênica (TOMIYAMA; HARRIS, 1987). Respostas imunológicas protegem a orelha interna de infecções, porém podem também causar lesões cocleares. Assim, o labirinto torna-se um alvo de respostas imunes, prejudicando as funções auditivas e de equilíbrio.

2.2. A etiopatogenia

Em 1974, SCHIFF e BROWN sugerem que a melhora de audição em pacientes com surdez súbita após administração de hormônio adrenocorticotrópico e heparina é indicativa de etiologia auto-imune, tendo como seu principal mecanismo de lesão a vasculite. A etiologia auto-imune deve ser considerada em pacientes com surdez neurosensorial rapidamente progressiva, com evolução do quadro em semanas a meses considerando que MCCABE (1979) descreve melhora da audição após tratamento com dexametasona e ciclofosfamida e comprova presença de vasculite no estudo histopatológico.

Modelos experimentais demonstraram correlação entre severidade das alterações na orelha interna e níveis séricos do anticorpo anti-colágeno tipo II, sugerindo que este anticorpo pode ter papel importante na SNIM (YOO et al., 1983; CRUZ et al., 1990; HELFGOTT et al., 1991), o que não foi comprovado por outros autores (HARRIS et al., 1986).

O saco endolinfático é considerado sítio importante também no processo imunopatológico (TOMIYAMA; HARRIS, 1987; GARCIA BERROCAL; RAMIREZ-CAMACHO, 2000). A destruição cirúrgica do saco endolinfático ou a obliteração de seu ducto reduz significativamente a resposta inflamatória contra antígenos, assim como atenua a lesão coclear (TOMIYAMA; HARRIS, 1987). Os capilares do saco endolinfático são fenestrados. São encontradas células imunocompetentes no seu interior em estado de repouso: polimorfonucleares, linfócitos T, linfócitos B e imunoglobulinas, sugerindo ser o local de início da resposta imune (HORMAZÁBAL, 1986; TOMIYAMA; HARRIS, 1987; TAKAHASHI; HARRIS, 1988). Porém, os leucócitos participantes do processo inflamatório parecem não ser provenientes do saco endolinfático (HARRIS; RYAN, 1995).

A resposta imunológica da orelha interna pode ser considerada como um importante protetor contra infecções. Por outro lado, a orelha interna também pode ser alvo de reações inflamatórias pela presença de anticorpos contra células do neuroepitélio coclear (NAIR et al., 1995), produzindo lesão tecidual.

Modelos experimentais demonstram que as alterações histopatológicas na orelha interna de animais com labirintite imunomediada são decorrentes da migração linfocitária. Mediadores inflamatórios são liberados e moléculas

de adesão participam na resposta imune (TAKASU; HARRIS, 1997; CHEN et al., 1998).

SATOH e colaboradores, em 2002, demonstram em camundongos que o Etanercept, proteína inibidora do receptor de TNF- α , atenuou significativamente a inflamação e fibrose coclear, sugerindo que o TNF- α produzido pelo infiltrado de células inflamatórias exerce um papel importante na regulação da resposta imune na SNIM.

3. Métodos Diagnósticos na Surdez Neurosensorial Imunomediada

A atividade auto-imune em pacientes com surdez neurosensorial idiopática tem sido avaliada por testes de transformação linfocitária (MCCABE, 1979; ARNOLD et al., 1987; HUGHES, 1986b), imunofluorescência (ARNOLD et al., 1987; PLESTER; SOLIMAN, 1989), dosagem de imunocomplexos circulantes (BROOKES, 1986; DEREBERY et al., 1991) e Western blot (HARRIS; SHARP, 1990; YAMANOBE; HARRIS, 1993; HUGHES et al., 1994).

Associados à um quadro clínico sugestivo, a dosagem de crioglobulinas, imunocomplexos circulantes e complemento total, velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa e imunoglobulinas séricas é útil para indicar processo inflamatório (GOLDENBERG; ASTRA, 1983; HUGHES et

al., 1984). Os testes de atividade inflamatória associados a imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinuclear (ANA), antimitocondrial, anti-músculo liso e anti-DNA não são relevantes na SNIM (ARNOLD; PFALTZ, 1987).

Com o objetivo de avaliar a atividade imune celular contra antígenos específicos da orelha interna, MCCABE (1979) utilizou-se do teste de inibição da migração linfocitária onde linfócitos dos pacientes eram testados contra antígenos de orelha interna extraídos durante cirurgias translabirínticas. Este teste mostrou-se positivo naqueles com suspeita de SNIM. Entretanto, devido à dificuldade de reprodutibilidade, com sensibilidade e especificidade questionáveis, este teste foi abandonado (HARRIS; RYAN, 1995). A transformação linfocitária (blastogênese) contra antígenos de orelha interna foi proposta por HUGHES e colaboradores (1983) como sendo o teste mais sensível para detecção de SNIM, principalmente durante a fase aguda e se os sintomas forem bilaterais. No entanto, as tentativas para confirmar esta hipótese não foram promissoras em outros centros de pesquisa.

Um estudo imunohistoquímico com imunofluorescência indireta, utilizando antígeno de orelha interna de cadáveres humanos, demonstrou cerca de 55% de positividade em uma amostra reduzida de pacientes com suspeita de surdez neurosensorial imunomediada (VIADA et al., 1993).

O *Western blot* pode ser utilizado na identificação de anticorpos séricos que supostamente reagem contra a orelha interna. Entretanto, a limitação é a disponibilidade de tecidos de orelhas internas humanas em quantidade suficiente para o procedimento. Em vista desta dificuldade, foram propostos extratos de osso temporal bovino ao passo que se demonstrou que reatividade é semelhante quando estes tecidos são utilizados como antígenos no *Western blot* (RAUCH et al., 1992). Segundo HIROSE e colaboradores (1999), o *Western blot* para uma proteína de 68kD (anti-68kD ou anti-hsp70) é o melhor teste prognóstico para resposta ao corticosteróide, com sensibilidade de 42%, especificidade de 90% e valor preditivo positivo de 91%. Porém, a validade da pesquisa do anticorpo anti68kD (ou anti-hsp70) tem sido questionada devido a presença de anti-hsp70 mesmo nos indivíduos normais (ROWLEY; KAROPOULOS, 1996; SAMUELSSON et al, 2003; YEOM et al, 2003).

Atualmente, são utilizados extratos antigênicos de osso temporal de boi, músculo e rim bovino na realização do *Western blot* (YAMANOBE; HARRIS, 1993; BILLINGS et al., 1995; GARCIA BERROCAL et al., 2002). Não há relato na literatura sobre a utilização de células HeLa, para extrato antigênico na realização do *Western blot*.

Recentemente, MAZLUMZADEH (2003) avalia através do PET(*positron emission tomography*) pequena amostra de pacientes com SNIM e hsp70

positivo. Encontra alteração na atividade da região de orelha interna e sugere que o PET pode ser um exame útil na avaliação da SNIM, principalmente quando a pesquisa para o hsp70 for positiva.

Ainda não existe critério ou teste diagnóstico aceito universalmente para diagnosticar esta entidade (RYAN et al., 2001).

OBJETIVOS

1. Objetivo principal

Determinar a presença de anticorpos séricos contra antígenos celulares de linhagem humana (células HeLa) nos pacientes com surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière

2. Objetivos secundários

a. Avaliar o perfil imunológico dos pacientes com surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière quanto aos testes inespecíficos incluindo: velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C-reativa (PCR), dosagem de imunoglobulinas séricas (subclasses IgG, IgM, IgA), crioglobulinas (Crio), dosagem de complemento C3 e C4 e do complemento hemolítico total (CH100), dosagem de imunocomplexos circulantes (IC) e pesquisa de anticorpo anti-*Borrelia Burgdorferi*,

b. Avaliar a presença de auto-anticorpos comumente encontrados em doenças reumáticas autoimunes: anticorpos anti-núcleo (ANA), anti-DNA nativo (anti-dsDNA), anti-cardiolipina (ACA) e fator reumatóide (FR).

CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo de Pesquisa nº 504/00. Todos os pacientes foram avaliados após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1. Casuística

Os 106 pacientes consecutivos foram encaminhados do Setor de Otoneurologia e do Ambulatório de Zumbido e da Enfermaria da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), no período de setembro de 2000 a março de 2003.

Outros 50 funcionários com audição normal foram encaminhados do Laboratório de Investigação Médica (LIM 17) da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A amostra foi constituída por dois grupos:

A. Grupo de Estudo (Ge)

a. Critérios de inclusão:

- pacientes com queixa de perda auditiva, com ou sem sintomas vestibulares, com ou sem zumbido, com diagnóstico de surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière.

b. Critérios de exclusão:

- doença neurológica ou psiquiátrica que impedisse avaliação dos parâmetros clínicos subjetivos (zumbido, tontura, flutuação da audição, sensação de plenitude auricular) e realização de exame audiométrico,
- perda auditiva neurossensorial de causa definida,
- tratamento prévio com imunossupressores e drogas citotóxicas,
- doença auto-imune sistêmica diagnosticada.

c. Critérios diagnósticos e definição dos subgrupos:

Os critérios adotados para o diagnóstico de Ménière (M), Surdez Súbita (SS) e Surdez Rapidamente Progressiva (RP) estão listados a seguir, assim como a definição de cada subgrupo.

c.1. Surdez Súbita (SS)

Este subgrupo foi formado por 25 pacientes (11 mulheres e 14 homens; média de idade $37,4 \pm 12,6$ anos) internados na Enfermaria da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HCFMUSP com diagnóstico de surdez súbita definida como perda auditiva neurossensorial de pelo menos 30dB em 3 frequências consecutivas, com período de instalação de horas a 3 dias (FRIEDMANN; ARNOLD, 1993).

c.2. Surdez Neurossensorial Rapidamente Progressiva (RP)

O subgrupo foi composto por 35 pacientes (25 mulheres e 10 homens, com média de idade $43,7 \pm 17$ anos com quadro de perda auditiva neurossensorial subaguda, progressiva ou flutuante, com evolução de semanas a meses, com acometimento uni ou bilateral (MCCABE, 1979).

c.3. Doença de Ménière (M)

Foram analisados 21 pacientes (18 mulheres e 3 homens, média de idade $40,1 \pm 12,2$ anos) segundo critérios estabelecidos pelo *Committee on Hearing and Equilibrium of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* em 1995.

d. Total de pacientes selecionados

De 106 pacientes avaliados, 25 foram excluídos por apresentarem surdez neurossensorial de causa definida ou tratamento prévio com corticosteróide oral.

2. Grupo Controle (Gc)

a. Critérios de inclusão:

- ausência de queixas otológicas,
- audiometria tonal normal nas frequências de 250 a 8000Hz, com limiar máximo de 25dB NA.

b. Critérios de exclusão

Foram utilizados os mesmos critérios de exclusão do grupo de estudo.

c. Total de indivíduos selecionados

De 50 indivíduos encaminhados, 2 foram excluídos devido a história de hipotireoidismo auto-imune e surdez unilateral congênita.

2. Métodos

Todos os 129 indivíduos (81 do Grupo de estudo e 48 do Grupo controle) foram submetidos aos seguintes procedimentos:

A. Protocolo clínico

O protocolo clínico foi aplicado sempre pela mesma médica (ANEXO A). Em seguida, os pacientes foram encaminhados para realização de audiometria, cujos resultados foram calculados pela média dos limiares tonais nas frequências de 500, 1000, 2000 e 3000Hz (*pure tone average – PTA*), conforme sugerido por MONSEL em 1995.

Os indivíduos com PTA acima de 25 dB NA foram classificados conforme abaixo (QUADRO 1):

QUADRO 1– GRAU DE PERDA AUDITIVA SEGUNDO VALOR DO PTA

Grau de perda auditiva	valor do PTA ⁽¹⁾
Leve	26 a 40 dB NA
Moderada	41 a 70 dB NA
Severa	71 a 90 dB NA
Profunda	maior que 90 dB NA

(1) PTA: *pure tone average* (média dos limiares tonais nas frequências de 500, 1000, 2000 e 3000Hz)

B. Protocolo laboratorial

O protocolo laboratorial constou dos seguintes exames:

a. Coleta e armazenamento de amostras de soro

Após a obtenção de amostras de sangue, os soros foram separados através de centrifugação a 1200 r.p.m. por 4 min, separados em alíquotas e armazenados a -20°C até o uso, sempre pelo mesmo profissional. Especialmente para a dosagem dos níveis séricos do complemento hemolítico total e dos imunocomplexos, foram utilizadas amostras de soro sem congelamento prévio, imediatamente após a coleta.

b. Avaliação do perfil imunológico pelos testes inespecíficos

Os testes descritos a seguir são indicados para avaliar o perfil do sistema imunológico de uma forma geral. Uma ressalva se faz ao teste para detecção de anticorpos anti-*Borrelia Burgdorferi*, indicada como *screening* para doença de Lyme (foi aqui incluído por não se ser um auto-anticorpo).

b.1. Exames de fase aguda

Estes incluíram os exames velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C-reativa (PCR).

O VHS foi determinado através do método de Westergren modificado (automatizado). A velocidade de hemossedimentação foi medida em milímetros por hora, de acordo com a sedimentação de eritrócitos em tubo-padrão.

A PCR foi medida por nefelometria, analisando a precipitação da amostra quando colocada com soro anti-PCR específico.

b.2. Dosagem de imunoglobulinas séricas

A dosagem de imunoglobulinas séricas nas suas subclasses IgG, IgM e IgA foi feita pelo método de imunoturbidimetria.

b.3. Detecção de crioglobulinas

Crioglobulinas foram detectadas mantendo 2ml de amostra de soro com sódio azida, a 4°C de temperatura, durante 72 horas.

b.4. Determinação dos níveis séricos de complemento e imunocomplexos circulantes

Foram dosados os níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento pela técnica de imunodifusão radial simples, utilizando placas (Behring-Werke AG, Marburg Germany), conforme orientações do fabricante.

O Complemento hemolítico total (CH100) e imunocomplexos circulantes (IC) foram dosados, respectivamente, por teste de imuno-hemólise e *capture* ELISA usando anticorpo anti-fração C1q humano. Foram considerados normais valores de 150 a 350 U/ml para o CH100 e menores que 35µg/ml para IC.

b.5. Pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia Burgdorferi* (ELISA) ou sorologia para doença de Lyme

Segundo GRODZICKI et al.(1998), placas de IMMULON (Dynatech Laboratories) foram sensibilizadas com extrato sonificado de *Borrelia Burgdorferi*, cepa americana G39/40, na concentração de 15µl/ml (200µl/poço), diluído em tampão carbonato e incubadas durante a noite em câmara úmida a 4°C. Após lavagem com solução tampão de PBS-Tween 20 (PBS-T) gelado a 0,05% (pH=7,4) e bloqueio com leite desnatado a 5% em PBS-T, por 1 hora, à temperatura ambiente, as placas foram incubadas com os soros a serem testados, juntamente com controles positivo e negativo, por 1 hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Amostras de soro haviam sido diluídas, em duplicata, em leite e PBS-T, nas concentrações de 1:100 e 1:400 para detecção de imunoglobulinas da classe IgM e IgG, respectivamente. Terminada nova lavagem, IgG de soro de cabra anti-IgG ou IgM humano conjugada à fosfatase alcalina (Sigma Chem. CO., St Louis, MO, EUA), diluída 1:1000 em leite desnatado em PBS-T, era adicionada aos poços (200µl/poço) e incubada por 1 hora. A revelação foi feita com o substrato revelador para-nitrofenilfostato de sódio (p-NPP) (Sigma Chem. CO., St Louis, MO, EUA), na concentração de 1mg/ml, diluído em tampão de glicina (pH=10,50). A reação foi mantida até que o controle positivo atingisse a densidade óptica próxima a 1. A absorbância foi determinada a 405 nm.

c. Pesquisas de Auto-anticorpos séricos

Foram realizadas no Laboratório de Imunologia Humoral da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM 17), sempre pelos mesmos profissionais.

Foram pesquisados os auto-anticorpos comumente encontrados em doenças reumáticas auto-imunes.

c.1. Anticorpos antinucleares (ANA) e anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA)

Foram pesquisados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como substrato antigênico as células HEp-2 para o ANA (células derivadas de carcinoma epidermóide de laringe humana) e os hemoflagelados *Crithidia luciliae* para pesquisa do anti-dsDNA.

c.1.1. Cultura de células HEp-2:

Estas células foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz e cultivadas em garrafas de vidro estéreis, contendo meio 199 (Instituto Adolfo Lutz, Brasil), em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Mantidas por cerca de 5 dias em cultivo, após tratamento e ressuspensão, as células foram transferidas para as lâminas de microscópio e recolocadas na estufa nas mesmas condições anteriores. Após 25 horas, as células em crescimento aderiram-se às lâminas que haviam sido depositadas em solução de Hanks (Instituto Adolfo Lutz,

Brasil). Em seguida, foram lavadas e fixadas a -20°C por 5 minutos com acetona (Merck, Brasil). As lâminas foram mantidas a -20°C até o uso.

c.1.2. Cultura de *Crithidia lucillae*

Crithidia lucillae, obtido no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade de São Paulo, é um protozoário hemoflagelado cujo cinetoplasto é um substrato altamente específico para anticorpos anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA). Esses hemoflagelados eram mantidos em cultura, em meio de FYTS, em estufa a 28°C por 24 horas. Após 3 lavagens com solução salina 0,15 M em tampão fosfato pH 7,3 (PBS), foram ressuspensos em albumina sérica bovina a 0,1% em água destilada. Essa suspensão foi colocada sobre lâminas de microscópio, as quais foram fixadas por 15 minutos à temperatura ambiente com etanol 95% e mantidas a -20°C até o uso.

c.1.3. Imunofluorescência indireta para ANA e anti-dsDNA

As amostras de soro foram diluídas a 1:40 em PBS com azida. A seguir, $25\mu\text{l}$ dessas diluições foram incubados em câmara úmida, a 37°C , por 45 minutos, com células HEP-2 ou *C. lucillae* fixadas em lâminas de microscópio para a pesquisa do ANA ou anti-dsDNA, respectivamente. As lâminas foram lavadas por 10 minutos com PBS com azida e, em seguida, foram submetidas a uma nova incubação, com adição de $20\mu\text{l}$ de fração de IgG de soro de cabra anti-imunoglobulina humana conjugada à fluoresceína

(Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA) na diluição de 1:50 e azul de Evans 3mg% em PBS com azida, durante 30 minutos, em câmara úmida, a 37°C. As lâminas foram então lavadas com PBS com azida e montadas com glicerina tamponada. A leitura do padrão de reatividade foi realizada em microscópio de fluorescência de epi-iluminação NIKON, com filtro de interferência de 515W e filtro de barreira (NIKON).

c.2. Anticorpo anticardiolipina (ACA)

Foi pesquisada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) (GHARAVI et al.,1987). A sensibilização das placas de microtitulação de poliestireno (Interlab, Brasil) foi feita com aplicação de 50µl de cardiolipina (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA) em etanol absoluto gelado na concentração de 50µg/ml. Após evaporação do solvente, o bloqueio foi realizado com 100µl de PBS contendo 30% de soro fetal bovino inativado (PBS-SFB), por 1 hora. Deu-se seguimento com lavagem das placas com PBS e incubação com 50µl de soro a ser testado, diluído em PBS-SFB, na concentração de 1:50, em duplicata, durante 2 horas. Após nova lavagem, uma fração com IgG de soro de cabra específica para IgG ou IgM humana conjugada à peroxidase (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA) era adicionada aos poços na diluição de 1:1.000 em PBS-SFB (50µl/poço), por 2 horas. A revelação se fez com adição de diamina ortofenileno – OPD (Sigma Chem. CO., St Louis, MO, EUA) na concentração de 500µg/ml em tampão citrato 0,1M. A reação foi interrompida pela adição de 25µl de ácido sulfúrico a 9M e a absorbância

determinada a 492nm (Labsystems). Para correções de variações diárias do método, uma curva de calibração foi estabelecida por meio de soros com concentrações conhecidas de anticorpos anti-fosfolípedes (IgG e IgM). Considerou-se positiva a amostra com densidade ótica acima da média de 7 soros normais acrescida de 3 desvios-padrão.

c.3. Fator Reumatóide (FR)

A pesquisa do Fator Reumatóide (FR) foi realizada por meio da aglutinação de partículas de látex recobertas com IgG humana segundo técnica previamente padronizada (Rapi Tek RF, Behringwerke AG, Marburg W, Alemanha). Os soros testados eram comparados, na mesma lâmina, com os soros controle positivo e negativo para FR. Havendo necessidade, os soros positivos eram diluídos seriadamente para a determinação do título do FR (a maior diluição do soro capaz de induzir a aglutinação das partículas de látex).

d. Estudo do padrão de reatividade auto-imune

Foi realizado pela técnica de "*Immunoblotting*" ou *Western blot*, utilizando como substrato antigênico o extrato salino total de células HeLa.

d.1 Preparo de extrato antigênico para a detecção de auto-anticorpos: Extrato Salino Total de Células HeLa

As células foram mantidas em cultura em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina (1.000UI e 100ug/ml, respectivamente), em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Foram removidas dos frascos quando atingiam o grau de crescimento adequado com auxílio de um raspador (*cell scraper*) em substituição ao tratamento enzimático com tripsina. As células em suspensão foram lavadas 3 vezes com PBS gelado e finalmente ressuspensas num menor volume possível de tampão de lise (10mM TRIS, 100mM NaCl, 0,05% NP40), contendo 1mM PMSF (*phenylmethyl sulfonyl fluoride*) como inibidor de enzimas proteolíticas. A seguir, as células foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento rápido a 37°C e sonicadas (três ciclos 35kHz/25seg). O extrato obtido foi aliquoteado e conservado na temperatura de -70°C até o seu uso. O teor protéico do extrato celular foi determinado pelo método de LOWRY, 1951, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

d.2 Western-blot

Após o preparo do extrato salino total de células HeLa, realizou-se a separação de seus componentes protéicos através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (Sigma Chem. Co., EUA) na presença de dodecil-sulfato de sódio (Sigma Chem. Co., EUA), utilizando o sistema de tampão

descontínuo descrito por LAEMMLI, 1970 (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* ou SDS-PAGE).

A eletroforese foi efetuada em minicuba de eletroforese (Hoefer Scientific Instruments, EUA). Os géis de separação e empilhamento foram compostos por 10% e 3% de acrilamida, respectivamente. O antígeno preparado a partir do extrato total salino de HeLa foi aplicado na concentração aproximada de 100 μ g de proteína por poço (15 μ L/ poço), iniciando-se a eletroforese, sob corrente constante. A seguir, no processo de transferência eletroforética, as frações protéicas separadas na eletroforese foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chem. Co., EUA), conforme descrito por TOWBIN et al., 1979.

Após avaliação da qualidade da eletroforese e transferência, a membrana de nitrocelulose, devidamente identificada, foi cortada em tiras, respeitando a corrida de cada poço do gel. O bloqueio do gel foi realizado com leite a 5% por pelo menos 2 horas. Os soros do Ge e Gc foram diluídos na concentração de 1:20 e incubados durante 90 minutos (cada fita de nitrocelulose foi banhada individualmente por um soro específico, devidamente identificado). Após três lavagens em TBS com Tween, as tiras foram colocadas em conjugado A3312 (Sigma Chem. Co., EUA) por 60 minutos. Após 3 novas lavagens, prosseguiu-se com a revelação das fitas de nitrocelulose.

A existência ou não de auto-reatividade foi determinada através da análise de cada gel de HeLa incubado com cada soro dos grupos de estudo e controle. Cada paciente foi testado pelo menos 2 vezes.

Cada banda identificada foi caracterizada através da determinação do peso molecular.

d3. Caracterização do antígeno-alvo

Os experimentos foram realizados conforme descrito por BONFÁ et al., 1993.

Para verificar se o epítipo era uma proteína sensível à tripsina, o extrato total de células HeLa foi pré-incubado com a tripsina (1 μ g de tripsina / 10 μ g do substrato) durante 1 hora, a 37°C, precedendo a eletroforese.

Para verificar se moléculas de carboidratos faziam parte da estrutura do epítipo, as tiras de nitrocelulose submetidas previamente à eletroforese foram tratadas com periodato de sódio 0,15 e 0,3M, antes da incubação das mesmas em solução bloqueadora.

3. Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida conforme as seguintes etapas (ALTMAN, 1991):

- a. preparo do banco de dados, com checagem de sua consistência;
- b. cálculo das médias aritméticas e respectivos desvios-padrão (DP) dos parâmetros clínicos e laboratoriais;
- c. comparação das médias de idade entre os 3 subgrupos através da análise de variância (ANOVA);
- d. comparação da distribuição por sexo e lateralidade entre os 3 subgrupos através do teste de qui-quadrado;
- e. comparação da média de idade de cada subgrupo com o grupo controle através do teste de t-student;
- f. comparação da distribuição por sexo de cada subgrupo com o grupo controle pelo teste do qui-quadrado;
- g. comparação dos parâmetros laboratoriais entre os 3 subgrupos pelo teste da razão de verossimilhança;
- h. comparação dos parâmetros laboratoriais de cada subgrupo com o grupo controle pelo teste exato de Fisher;
- i. cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson e respectivos intervalos de confiança de 95%;

j. construção e ajuste dos modelos de regressão logística univariada para estudo das relações entre os 3 subgrupos de pacientes e a variável dependente (antígenos de diversos pesos moleculares identificados no WB).

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Adotou-se como nível de significância estatística o valor de $p \leq 0,05$, conforme preconizado para ensaios biológicos.

RESULTADOS

1. Análise dos dados clínicos e demográficos

A distribuição por sexo não foi homogênea entre os subgrupos de SS, RP e M ($p=0,008$). A maioria dos pacientes com doença de Ménière era do sexo feminino (85,7%; $p=0,038$), mostrando-se diferente do grupo controle (TABELA 2). Os subgrupos RP e SS não foram diferentes do grupo controle considerando a distribuição de sexo.

A média de idade do grupo de estudo foi de $40,8 \pm 14,8$ anos e o grupo controle apresentou média de $36,8 \pm 10,9$ anos. O subgrupo RP apresentou média de idade significativamente diferente do grupo controle, com $p=0,043$. Entretanto, os três subgrupos (SS, RP, M) mostraram-se homogêneos entre si quanto a distribuição de média de idade (TABELA 2).

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DE IDADE E SEXO NOS SUBGRUPOS DE PACIENTES COM SURDEZ SÚBITA, SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA E DOENÇA DE MÉNIÈRE E NO GRUPO CONTROLE

SUBGRUPO	IDADE (média ± DP anos)	SEXO				Total (n)
		Feminino		Masculino		
		n	%	n	%	
SS	37,4 ± 12,6	11	44,0	14	56,0	25
RP	43,7 ± 17,0	25	71,4	10	28,6	35
M	40,1 ± 12,2	18	85,7	3	14,3	21
Controle	36,8 ± 10,9	29	60,4	19	39,6	48
TOTAL	39,3 ± 13,6	83	64,3	46	35,7	129

DP: desvio-padrão; n: número de casos; SS: surdez súbita; RP: surdez rapidamente progressiva; M: doença de Ménière.

Com relação à lateralidade, o acometimento unilateral foi observado em 54,3% dos 81 pacientes estudados. A incidência mais alta de doença unilateral foi observada no subgrupo de SS (84%). Nos subgrupos RP e M, a perda auditiva foi unilateral em 42,9% e 38,1%, respectivamente (TABELA 3).

TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO QUANTO A LATERALIDADE NOS PACIENTES COM SURDEZ SÚBITA, SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA E DOENÇA DE MÉNIÈRE

TIPO DE SURDEZ	ACOMETIMENTO				TOTAL (<i>n</i>)
	Unilateral		Bilateral		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Surdez súbita	21	84,0	4	16,0	25
Surdez rapidamente progressiva	15	42,9	20	57,1	35
Ménière	8	38,1	13	61,9	21
TOTAL	44	54,3	37	45,7	81

n: número de casos

O zumbido foi a queixa mais freqüentemente encontrada (66,7%), seguida por vertigem (46,9%), flutuação da audição (27,2%) e plenitude auricular (19,8%). Os três últimos sintomas foram mais comuns na doença de Ménière (TABELA 4).

TABELA 4 – PERFIL DOS PACIENTES PORTADORES DE SURDEZ SÚBITA, SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA E DOENÇA DE MÉNIÈRE QUANTO À PRESENÇA DE ZUMBIDO, TONTURA, PLENITUDE AURICULAR E FLUTUAÇÃO DA AUDIÇÃO

SINTOMAS	SURDEZ SÚBITA (n=25)		SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA (n=35)		MÉNIÈRE (n=21)	
	n	%	n	%	n	%
	Zumbido	19	76,0	22	62,9	13
Vertigem	10	40,0	15	42,6	13	61,9
Plenitude auricular	1	4,0	5	14,3	10	47,6
Flutuação da audição	3	12,0	11	31,4	8	38,1

n: número de casos

A análise da média dos limiares auditivos (PTA) dos 81 pacientes avaliados mostrou um PTA médio de $57 \pm 21,2$ dB NA. A surdez moderada foi mais freqüentemente encontrada nos pacientes dos subgrupos RP (51,4%) e SS (40%). Por outro lado, o grau de perda auditiva mais encontrado no subgrupo M foi a surdez de grau leve (48%).

2. Avaliação do perfil imunológico pelos testes inespecíficos

Dos exames de fase aguda, somente o VHS mostrou diferença estatisticamente significativa, tendo sido mais freqüente em pacientes com RP (31,4%). Neste subgrupo (RP), alterações na dosagem sérica de IgG (34,3%; $p=0,044$) e fração C4 do complemento (11,4%; $p=0,034$) também foram significantes em comparação aos outros subgrupos.

Anticorpos anti-Borrelia Burgdorferi estiveram presentes nos pacientes com doença de Ménière (23,8%).

Outros testes estiveram raramente alterados.

O grupo controle apresentou todos os exames normais.

O perfil dos testes inespecíficos em cada subgrupo está demonstrado na TABELA 5.

TABELA 5 – PERFIL DOS PACIENTES PORTADORES DE SURDEZ SÚBITA, SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA E DOENÇA DE MÉNIÈRE QUANTO A PRESENÇA DE TESTES INESPECÍFICOS ALTERADOS

TESTE	SURDEZ SÚBITA (n=25)		SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA (n=35)		DOENÇA DE MÉNIÈRE (n=21)		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
ESR	3	12	11	31,4	1	4,8	0,022
CRP	4	16	8	22,9	2	9,5	0,424
IgG	2	8,0	12	34,3	5	23,8	0,044
IgA	5	20,0	5	14,3	4	19,0	0,819
IgM	7	28,0	15	42,9	9	42,9	0,437
Crio	0	0	0	0	0	0	-
C3	0	0	0	0	0	0	-
C4	0	0	4	11,4	0	0	0,034
CH100	0	0	0	0	0	0	-
IC	1	4,0	5	14,3	4	19,0	0,224
Lyme	3	12,0	1	2,9	5	23,8	0,049

n: número de casos; *p*: valor de *p* ao teste da razão de verossimilhança; VHS: velocidade de homossedimentação; PCR: proteína C-reativa; IgG, IgA, IgM: imunoglobulinas da subclasse G, A, M, respectivamente; Crio: crioglobulinas; C3, C4: frações C3 e C4 do complemento, respectivamente; CH100: complemento hemolítico total; IC: imunocomplexos circulantes. Destaque em negrito para os valores de *p* com diferença estatisticamente significativa.

3. Análise dos autoanticorpos séricos

De 81 soros analisados, 5 (6,2%) apresentaram reatividade para o anticorpo antinúcleo (ANA). e apenas 1 (1,2%) mostrou positividade para o fator reumatóide.

Os anticorpos anti-cardiolipina e anti-dsDNA foram negativos em todos os subgrupos (TABELA 6).

TABELA 6 – PERFIL DOS PACIENTES PORTADORES DE SURDEZ SÚBITA SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA E DOENÇA DE MÉNIÈRE QUANTO A PRESENÇA DE SÉRICOS

TESTE	SURDEZ SÚBITA (n=25)		SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA (n=35)		DOENÇA DE MÉNIÈRE (n=21)		p
	n	%	n	%	n	%	
ANA	1	4,0	4	11,4	0	0	0,124
ds-DNA	0	0	0	0	0	0	-
ACA	0	0	0	0	0	0	-
FR	0	0	1	2,9	0	0	0,429

n: número de casos; p: valor de p ao teste da razão de verossimilhança;

ANA: anticorpo antinúcleo; ds-DNA: anticorpo anti-DNA de dupla hélice;

ACA: anticorpo anti-cardiolipina; FR: fator reumatóide.

4. Detecção de anticorpos contra células HeLa pelo *Western blot*

Pela realização do WB, observou-se reatividade significativa contra extrato de células HeLa.

Foram detectados autoanticorpos contra moléculas de 32, 38, 42, 48, 52, 58, 62 e 66kD. Cada subgrupo (SS, RP,M) foi comparado ao grupo controle com o objetivo de selecionar as reatividades mais significantes. Os antígenos de peso molecular 38, 58 e 66kD não foram considerados devido a sua alta frequência também nos indivíduos com audição normal (grupo controle).

a. Detecção e caracterização de autoanticorpos contra células HeLa na surdez súbita

Reatividade importante contra antígeno de células HeLa foi observada neste subgrupo. Autoanticorpos contra antígenos de 48 e 62kD estavam presentes em 40% e 36%, respectivamente (Figura 1). Além disso, 12 % (3/25) dos pacientes apresentaram ambas as bandas (Figura 1, linha a).

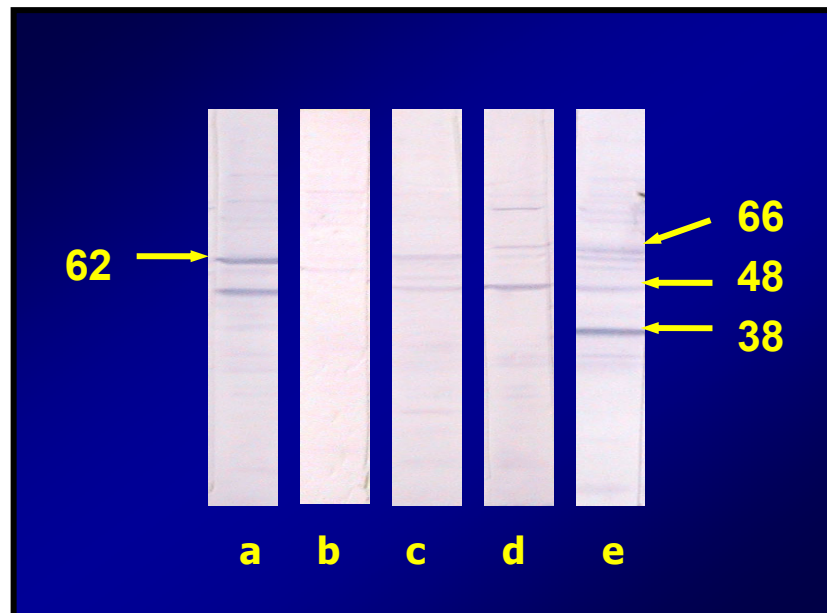


FIGURA 1 - Reatividade dos pacientes (a, c, d, e) portadores de surdez súbita e indivíduo normal (b) contra células HeLa no *Western blot*. Os números ao lado representam os pesos moleculares em quilodaltons.

Comparados com o grupo controle, pacientes com SS mostraram diferença estatística quanto a presença de autoanticorpos contra os antígenos de 48 e 62kD (TABELA 7).

TABELA 7 – PERFIL DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE E DOS PACIENTES PORTADORES DE SURDEZ SÚBITA QUANTO À REATIVIDADE CONTRA CÉLULAS HELA NO WESTERN BLOT

BANDA NO WESTERN BLOT (kD)	NORMAIS (n=48)		SURDEZ SÚBITA (n=25)		p
	n	%	n	%	
32	0	0	0	0	-
38	6	12,5	5	20,0	0,494
42	2	4,2	4	16,0	0,172
48	4	8,3	10	40,0	0,003
52	4	8,3	3	12,0	0,685
58	12	25,0	2	8,0	0,118
62	1	2,1	9	36,0	<0,0001
66	4	8,3	6	24,0	0,081
>66	21	43,8	9	36,0	0,619

n: número de casos; p: valor referente ao teste exato de Fisher. Destaque em negrito para os valores de p com diferença estatisticamente significativa.

Quanto a caracterização dos antígenos de 48 e 62kD, o tratamento do extrato de células HeLa com tripsina, demonstrou-se que ambas as reatividades foram abolidas (Figura 2, linha a). Portanto, ambos antígenos são sensíveis à tripsina. Por outro lado, ao utilizarmos o metaperiodato, não observamos nenhuma na reatividade (Figura 2, linha c). Isto sugere que o determinante antigênico (ou epítipo) não possui carboidrato, ou seja, não se trata de uma glicoproteína.

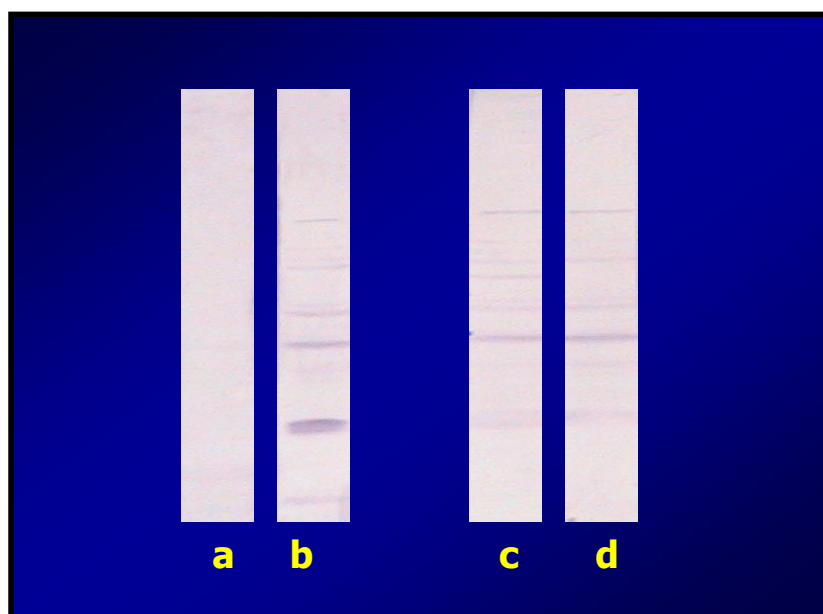


FIGURA 2 – Tratamento prévio das células HeLa com tripsina (a) e metaperiodato (c) na surdez súbita. As reatividades em células HeLa não tratadas estão representadas por b e d. O tratamento com tripsina aboliu a reatividade por completo.

b. Detecção e caracterização de autoanticorpos contra células HeLa na surdez rapidamente progressiva

Neste subgrupo, 4 antígenos de células HeLa foram detectadas: 32, 42, 48 e 62kD. A reatividade ao antígeno de 48kD foi a mais freqüente, sendo encontrada em 37,1% ($p=0,002$) dos pacientes. A segunda reatividade mais comum foi observada contra o antígeno de 62kD (25,7%; $p=0,001$). O anticorpo contra o antígeno de 42kD foi demonstrado em 20%, com $p=0,032$. Com menor freqüência, porém estatisticamente significativa, o anticorpo contra antígeno de 32kD também foi encontrado (11,4%; $p=0,028$) (TABELA 8) (Figura 3).

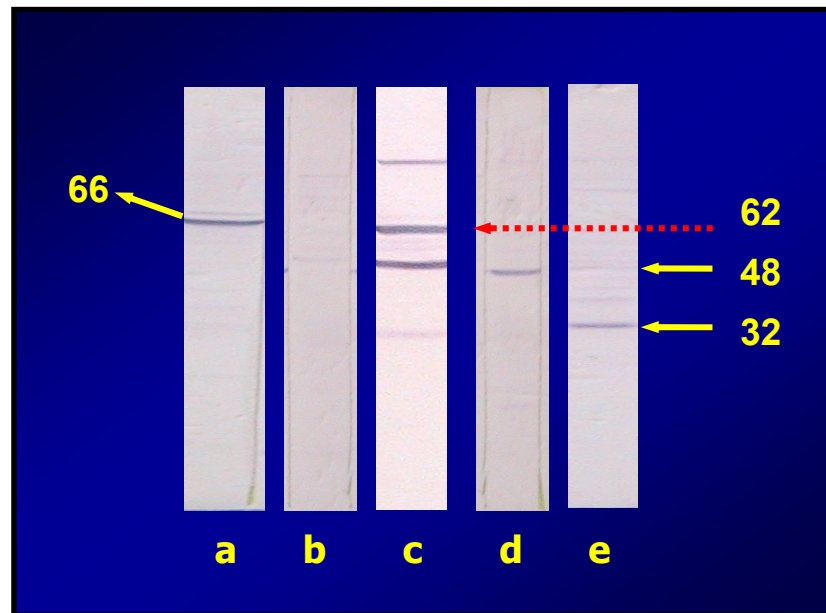


FIGURA 3 - Reatividade dos pacientes portadores de surdez rapidamente progressiva (a, c, d, e) e indivíduo normal (b) contra células HeLa no *Western blot*. Os números ao lado representam os pesos moleculares em quilodaltons.

TABELA 8 – PERFIL DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE E DOS PACIENTES PORTADORES DE SURDEZ RAPIDAMENTE PROGRESSIVA QUANTO REATIVIDADE CONTRA CÉLULAS HELA NO WESTERN BLOT

BANDA NO WESTERN BLOT (kD)	NORMAIS (n=48)		RAPIDAMENTE PROGRESSIVA (n=35)		p
	n	%	n	%	
32	0	0	4	11,4	0,028
38	6	12,5	0	0	0,037
42	2	4,2	7	20,0	0,032
48	4	8,3	13	37,1	0,002
52	4	8,3	0	0	0,134
58	12	25,0	6	17,1	0,432
62	1	2,1	9	25,7	0,001
66	4	8,3	4	11,4	0,716
>66	21	43,8	16	45,7	1,000

n: número de casos; p: valor referente ao teste exato de Fisher. Destaque em negrito para os valores de p com diferença estatisticamente significativa.

A reatividade aos antígenos de 32, 42 e 62kD foi completamente abolida com o tratamento com tripsina. No entanto, de forma inesperada, a reatividade contra o antígeno de 48kD não foi abolida com esta enzima. Portanto, este antígeno é caracterizado por uma resistência marcante à

tripsina. A exposição ao metaperiodato não mudou o padrão de reatividade (Figura 4, linhas c, d, e, f).

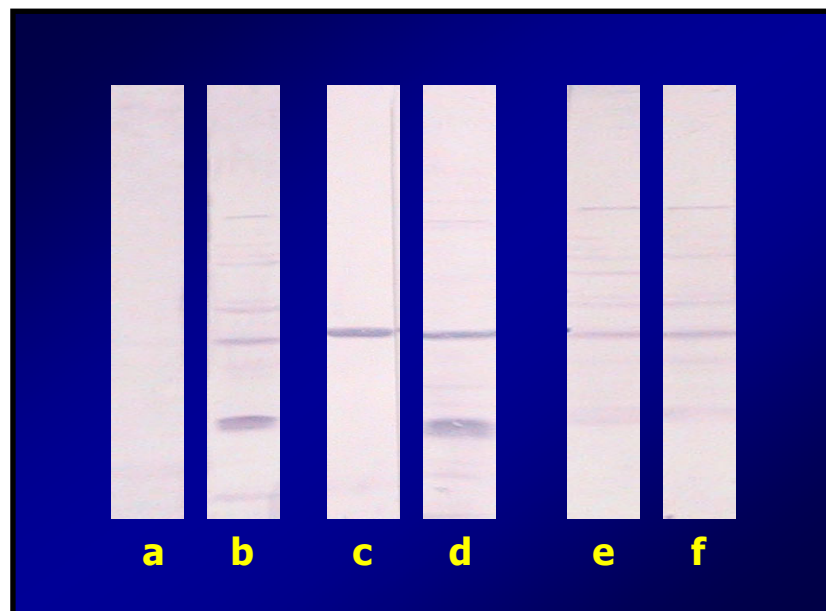


FIGURA 4 – Tratamento prévio das células HeLa com tripsina (a, c) e metaperiodato (e). As reatividades em célula HeLa sem tratamento estão representadas em b, d, f. Paciente portador de surdez súbita em a, b; Paciente portador de surdez surdez rapidamente progressiva em c, d, e, f. Observa-se que o antígeno é resistente à tripsina na surdez rapidamente progressiva (c). diferentemente da surdez súbita (a).

c. Detecção e caracterização de autoanticorpos contra células HeLa na doença de Ménière

Os soros dos pacientes deste grupo apresentaram pouca reatividade contra antígenos de células HeLa, quando comparados aos outros subgrupos. A reatividade assumiu um padrão heterogêneo. A reatividade mais marcante neste grupo foi contra o antígeno de 42kD, reconhecido em 38,1% dos casos, com diferença estatisticamente significativa (TABELA 9) (Figura 5).

À semelhança do subgrupo de SS, a caracterização do antígeno mostrou-se sensível ao tratamento com tripsina e também não mostrou diferença na reatividade quando o metaperiodato foi utilizado.

A reatividade dos três subgrupos está ilustrada na Figura 5.

TABELA 9 – PERFIL DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE E PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA DE MÉNIÈRE QUANTO REATIVIDADE CONTRA CÉLULAS HELA NO *WESTERN BLOT*

BANDA NO <i>WESTERN</i> <i>BLOT</i> (kD)	NORMAIS (n=48)		MÉNIÈRE (n=21)		p
	n	%	n	%	
32	0	0	1	4,8	0,304
38	6	12,5	2	9,5	1,000
42	2	4,2	8	38,1	0,001
48	4	8,3	3	14,3	0,667
52	4	8,3	1	4,8	1,000
58	12	25,0	5	23,8	1,000
62	1	2,1	2	9,5	0,218
66	4	8,3	4	19,0	0,235
>66	21	43,8	9	42,9	1,000

n: número de casos; p: valor referente ao teste exato de Fisher. Destaque em negrito para os valores de p com diferença estatisticamente significativa.

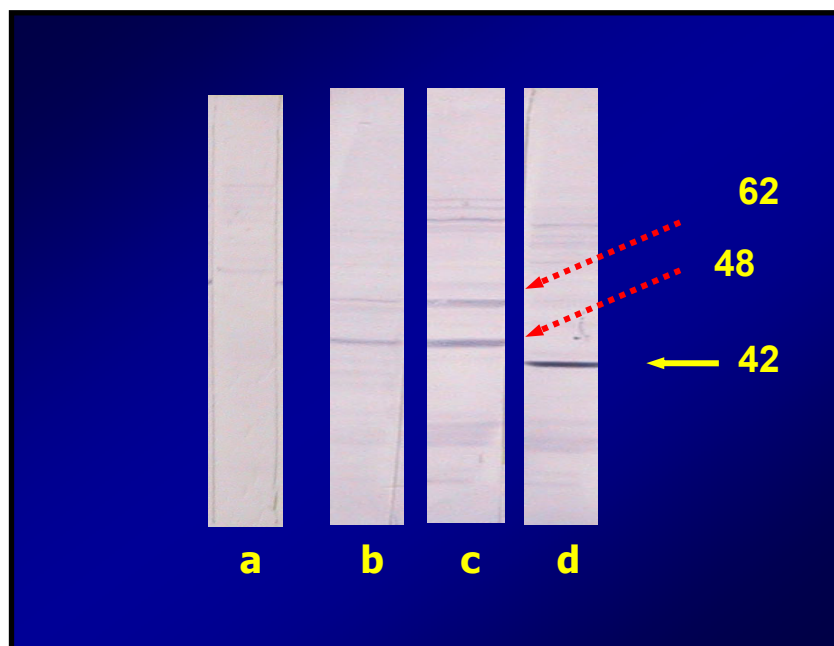


FIGURA 5 - Reatividade dos pacientes portadores de surdez súbita (b), surdez rapidamente progressiva (b), doença de Ménière e indivíduo normal (a) contra células HeLa no *Western blot*. Os números ao lado representam os pesos moleculares em quilodaltons.

DISCUSSÃO

A surdez neurossensorial imunomediada (SNIM), descrita pela primeira vez como uma entidade clínica por MCCABE em 1979, incluía perdas auditivas de caráter neurossensorial, geralmente bilateral, porém assimétrica, de instalação subaguda (progressão em semanas a meses, nunca em anos) e que respondiam ao tratamento com corticosteróides. HUGHES (1983) demonstra reatividade autoi-mune em pacientes com doença de Ménière e síndrome de Cogan inclusive em pacientes com doença unilateral. Outro autor evidencia a presença de imunocomplexos mesmo naqueles pacientes com doença de Ménière unilateral, sugerindo a possibilidade da etiologia imunomediada estar envolvida também nos casos de comprometimento unilateral (BROOKES, 1986). Em nosso estudo, cerca de 43% dos pacientes com surdez rapidamente progressiva apresentaram perda auditiva unilateral. O comprometimento unilateral foi ainda maior no subgrupo de surdez súbita (84%). Mesmo assim, número razoável de pacientes com surdez unilateral (súbita ou rapidamente progressiva) apresentaram resposta favorável ao tratamento com corticosteróide, sugerindo que mesmo nos quadros unilaterais a SNIM deve ser suspeitada.

Com relação ao tempo de progressão, MCCABE (1979), quando descreve a SNIM, usa a etiologia imunomediada como sinônimo de surdez rapidamente progressiva, onde a perda auditiva não deve progredir em dias, nem em anos, mas em semanas a meses. Porém, tem-se observado a etiologia imunomediada relacionada a quadros de surdez de instalação súbita, assim como a quadros mais insidiosos, com progressão em anos (HUGHES et al., 1986b).

Dentro deste contexto, atualmente considera-se que SNIM pode iniciar em qualquer idade, sendo caracterizada por perda auditiva uni ou bilateral, de instalação súbita, progressiva ou flutuante, com ou sem associação com sintomas vestibulares. O sintoma vestibular pode ocorrer isoladamente (HUGHES et al, 1985; SOLIMAN, 1992).

Quanto à distribuição de sexo e idade, a nossa amostra não se mostrou homogênea, bem como o tamanho da amostra foi insuficiente, o que pode ter limitado a análise dos resultados. Outros estudos controlados, com maior amostragem são necessários. De qualquer forma, o nosso grupo estudado foi composto por maior número de mulheres, com média de idade próxima à meia idade, concordando com a literatura (MCCABE, 1979; GARCIA CALLEJO et al., 2003).

Como visto anteriormente, os critérios clínicos para o diagnóstico da SNIM são conflitantes e exames laboratoriais podem auxiliar assim como o teste terapêutico com imunossupressores. No entanto, o teste terapêutico com imunossupressores é passível de sérios efeitos colaterais, portanto não podem ser utilizados inadvertidamente.

Diversos exames laboratoriais são recomendados na avaliação inicial do paciente com surdez rapidamente progressiva, incluindo pesquisas de auto-anticorpos, imunocomplexos circulantes, VHS e PCR e pesquisas de doenças infecciosas como sífilis e doença de Lyme (SOLIMAN, 1992; HIROSE et al., 1999).

Imunocomplexos circulantes são detectados em pacientes com surdez neurossensorial idiopática com resposta favorável ao corticosteróide, assim como em pacientes com doença de Ménière (BROOKES, 1986). Porém, nenhuma relação entre presença de imunocomplexos e atividade da doença de orelha interna foi encontrada. A detecção de imunocomplexos circulantes é bastante diferente nos diversos estudos, pois depende das condições fisiológicas (GARCIA CALLEJO, 2003). No presente estudo, 10 pacientes apresentaram aumento de imunocomplexos circulantes, porém não observamos relação com reatividade ao WB.

A pesquisa da velocidade de sedimentação é um exame inespecífico e tem um valor relativo no acompanhamento das doenças inflamatórias e da resposta terapêutica. Com poucas exceções, se normal, o VHS tem validade clínica por excluir inflamação ativa ou doença sistêmica (HIROSE et al., 1999). Entretanto, o VHS pode estar aumentado em infecções bacterianas, doenças linfoproliferativas, inclusive na gravidez e no pós-parto. Ainda assim, este teste é recomendado por muitos autores que evidenciam o seu aumento em pacientes com suspeita de SNIM (GARCIA BERROCAL et al., 1995; HARRIS; RYAN, 1995; HIROSE et al., 1999).

Considerando a participação da imunidade humoral na patogênese da SNIM, são descritos testes para avaliar presença de auto-anticorpos séricos específicos ou não-específicos para a orelha interna. A imunofluorescência indireta tem sido realizada utilizando diversas linhagens celulares como as de tecido endotelial e osso temporal humano. Detecção de auto-anticorpos não-específicos para orelha interna é relatada em estudos envolvendo doença de Ménière e SNIM (BROOKES, 1986). Neste estudo, a pesquisa de auto-anticorpos comumente presentes em doenças reumáticas auto-imunes (ANA, FR, anti-dsDNA, ACA) mostrou-se negativa na maioria dos casos e os testes inespecíficos também não apresentaram relevância clínica, apesar dos pacientes com RP terem apresentado dosagens de IgG, C4 e VHS estatisticamente significativas. Alguns pacientes continuam em acompanhamento no Departamento de Reumatologia com suspeita de

doença sistêmica auto-imune (um paciente com diagnóstico de artrite reumatóide, outro com miastenia gravis e 3 com hipotireoidismo auto-imune).

Em um estudo piloto, 16 pacientes com surdez súbita tiveram indicação de tratamento com corticosteróide, porém seus exames inespecíficos foram quase sempre negativos. Ainda assim, 13 apresentaram resposta positiva ao corticosteróide, sugerindo que a etiologia auto-imune pode estar envolvida, mesmo apresentando testes inflamatórios inalterados.

Enfim, não há concordância entre a maioria dos autores a respeito do protocolo de exames a ser seguido. Entretanto, a maioria concorda que os testes de atividade inflamatória têm maior relevância clínica do que a dosagem sérica de auto-anticorpos como o anticorpo antinúcleo e o fator reumatóide (HIROSE, 1999; GARCIA CALLEJO, 2003).

Este estudo descreveu a presença de um auto-anticorpo nos soros de três entidades otológicas nas quais a etiologia imunomediada pode estar envolvida. Este é o primeiro estudo em que se demonstrou a reatividade do soro de pacientes com surdez súbita, surdez rapidamente progressiva e doença de Ménière contra células HeLa utilizando o WB. As células HeLa são células de linhagem humana largamente utilizadas em diversas linhas de pesquisa científica, inclusive em laboratórios de imunologia para exames de

rotina, mas nunca foram utilizadas contra soro de pacientes com surdez neurossensorial.

Considera-se a doença auto-imune como uma seqüela patológica de uma resposta auto-imune. A auto-imunidade é evidenciada pela presença de anticorpos ou linfócitos T autorreativos (PETER; SHOENFELD, 1996). Os auto-anticorpos são relativamente comuns em indivíduos saudáveis e resultam de mecanismos fisiológicos. A presença destes auto-anticorpos em baixos títulos, sem quadro clínico compatível, não serve de parâmetro diagnóstico. A maioria dos auto-anticorpos não contribuem diretamente na patogênese da doença, mas podem ser utilizados como marcadores prognósticos ou de atividade da doença. A identificação de um auto-anticorpo contra células HeLa não esclarece a fisiopatologia da SNIM, mas pode, eventualmente, ser um marcador. Para tanto, outros estudos são necessários para avaliação desta possibilidade.

Em um estudo piloto, células HeLa foram submetidas ao aquecimento a 42,5°C, durante 3 horas, para indução de proteínas de estresse (*heat shock proteins*), conforme procedimento descrito por BILLINGS et al. (1995). Os soros dos mesmos pacientes deste estudo (SS, RP, M) foram testados por WB, contra o extrato de células HeLa pré-aquecidas. Não se observou reatividade contra estas células HeLa pré-aquecidas, sugerindo que o auto-anticorpo identificado não é um anticorpo anti-*heat shock protein*.

A diferença na resposta ao tratamento com tripsina demonstra que o auto-anticorpo contra o antígeno de 48kD detectado na surdez súbita e na doença de Ménière é diferente do auto-anticorpo de mesmo peso molecular detectado na surdez rapidamente progressiva. Além disso, os padrões de reatividades são diferentes em cada subgrupo. Conseqüentemente, se estes achados forem confirmados no futuro, cada padrão de reatividade poderá auxiliar na diferenciação de cada uma das entidades.

A relevância deste achado ainda é desconhecida. Estudos posteriores são necessários para melhor caracterização destes antígenos. A reatividade contra células HeLa deve ser comparada com a resposta ao corticosteróide e evolução clínica para melhor estabelecimento da relação entre esta reatividade e a surdez neurossensorial imunomediada. Testes imunohistoquímicos podem ser úteis para comprovação desta reatividade no tecido de orelha interna.

CONCLUSÕES

1. O estudo demonstrou a presença de auto-anticorpos contra antígenos de células de linhagem humana (HeLa), especialmente nos pacientes com surdez súbita e surdez rapidamente progressiva.
2. Os testes inespecíficos não se mostraram relevantes nos pacientes estudados.
3. A pesquisa de auto-anticorpos comumente encontrados em doenças sistêmicas reumáticas auto-imunes não foi relevante nos pacientes estudados.

ANEXOS

EXAMES COMPLEMENTARES

BERA:

ECOG:

EOA:

Processamento Central:

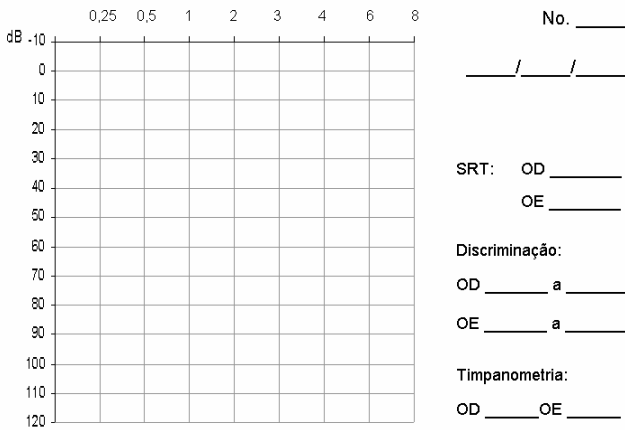
CT ossos temporais:

RM:

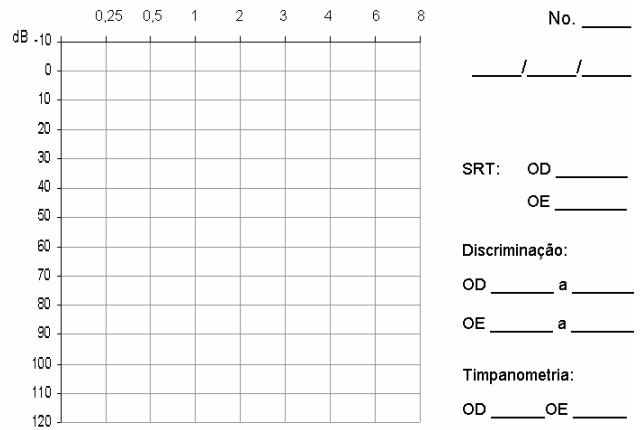
Angiorressonância:

Outros:

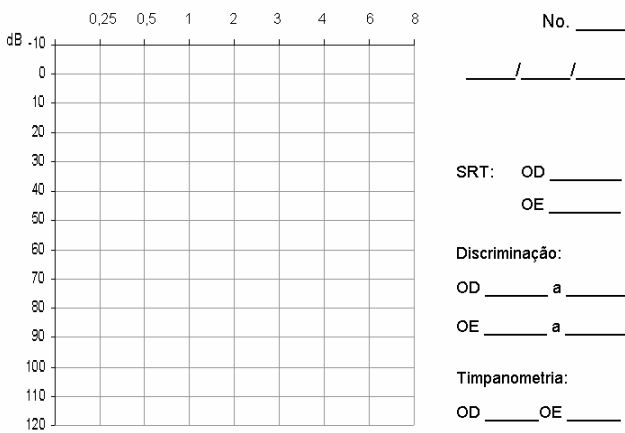
EVOLUÇÃO



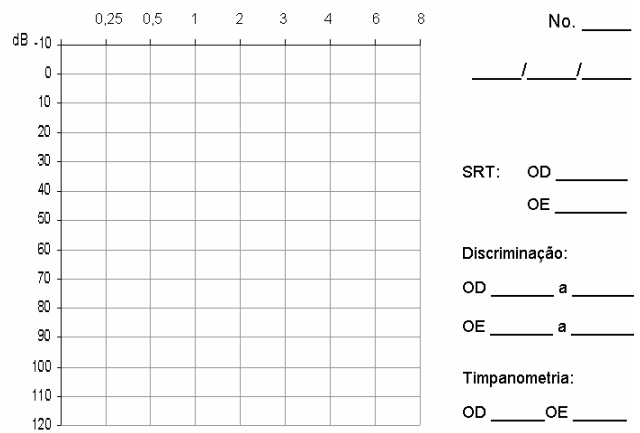
medicação: _____ D ____
 dose: _____ Ef. Colat: _____



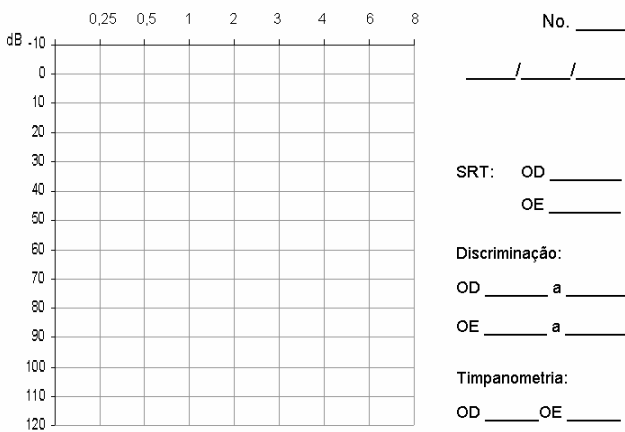
medicação: _____ D ____
 dose: _____ Ef. Colat: _____



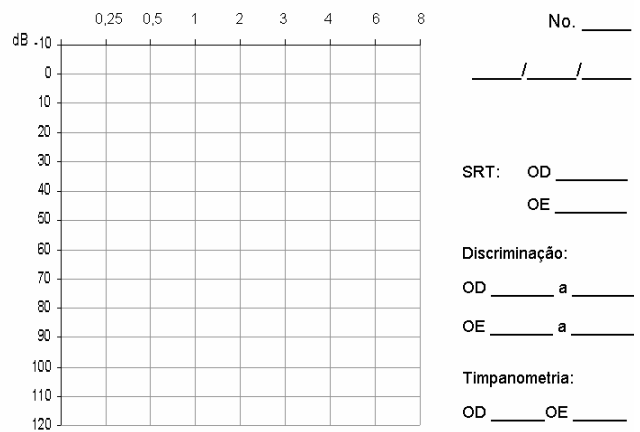
medicação: _____ D ____
 dose: _____ Ef. Colat: _____



medicação: _____ D ____
 dose: _____ Ef. Colat: _____



medicação: _____ D ____
 dose: _____ Ef. Colat: _____



medicação: _____ D ____
 dose: _____ Ef. Colat: _____

ANEXO B – CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE MÉNIÈRE
(COMMETTEE ON HEARING AND EQUILIBRIUM OF AMERICAN
ACADEMY OF OTOLARYNGOLOGY-HEAD AND NECK SURGERY)

Para diagnóstico de doença de Ménière:

Duas crises de vertigem acompanhadas de perda auditiva, zumbido e/ou plenitude auricular com as seguintes características:

1. Vertigem

- Definição: sensação de tontura rotatória recorrente, em crises.
- crises: de vertigem espontânea com duração de pelo menos 20 minutos;
- geralmente acompanhada de sensação de desequilíbrio (que pode durar dias);
- geralmente acompanhada de náuseas e vômitos;
- sem perda da consciência;
- quase sempre com nistagmo horizontal ou horizonto-rotatório durante as crises;

2. Perda auditiva

Deve ser documentada por audiometria em pelo menos 1 ocasião e deve ser de uma das seguintes formas:

- média aritmética dos limiares auditivos em 250, 500 e 1000Hz maior ou igual a 15dB em relação a média aritméticas dos limiares auditivos em 1000, 2000 e 3000 Hz;

- Acometimento unilateral: a média aritmética dos limiares auditivos em 500, 1000, 2000 e 3000Hz é maior ou igual a 20dB no ouvido acometido quando comparado com o lado contralateral;

- Acometimento bilateral: a média aritmética dos limiares auditivos em 500, 1000, 2000 e 3000Hz maior do que 25dB no ouvido a ser estudado;

- Observação: se o pesquisador julgar que existem razões justificáveis na audiometria para caracterização como doença de Ménière, este diagnóstico pode ser dado, mas o critério adotado deve ser descrito.

2.1. Quanto à evolução da audição

A piora da audição pode ser determinada por:

- média aritmética dos limiares auditivos em 500, 1000, 2000 e 3000Hz apresentar piora igual ou maior que 10dB ou
- apresentar piora de pelo menos 15% na discriminação

3. Flutuação da audição:

Não é essencial para o diagnóstico.

4. Plenitude auricular

(veja no item à seguir)

5. Zumbido

Plenitude auricular ou zumbido (ou ambos) deve estar presente durante a crise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN DE. Practical statistics for medical research. London, Chapman & Hall, 1991.

ALVARENGA EHL, CRUZ OLM, GRELLET M, COLAFÊMINA JF. Disacusia sensorineural auto-imune: avaliação auditiva em pacientes portadores de doença auto-imune. Rev Bras Otorrinol 1999;65(1):50-57.

ARNOLD W. Systemic autoimmune diseases associated with hearing loss. Ann N Y Acad Sci 1997;830:187-202.

ARNOLD W, PFALTZ R. Critical evaluation of immunofluorescence microscopic test or identification of serum antibodies against human inner ear tissue. Acta Otolaryngol (Stock) 1987; 103:373-8.

ARNOLD W, PFALTZ R, ALTERMATT HJ. Evidence of serum antibodies against inner ear tissues in the blood of patients with certain sensorineural hearing disorders. Acta Otolaryngol (Stockh) 1985; 99:437-444.

BARKER CF, BILLINGHAM RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25:1-54.

BILLINGS PB, KEITHLEY EM, HARRIS JP. Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:181-8.

BONFA E, VIANA VST, BARRETO ACP, YOSHINARI NH, COSSERMELLI W. Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Thypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *J Immunol* 1993; 150:3917-23.

BROOKES GB. Circulating immune complexes in Ménière's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:536-540.

CAMPBELL KC, KLEMENS JJ. Sudden hearing loss and autoimmune inner ear disease. *J Am Acad Audiol* 2000,11:361-7.

CHANG EH, VAN CAMP G, SMITH RJH. The role of connexins in human disease. *Ear Hear* 2003;24:314-323.

CHEN MC, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Immunohistochemical analysis of proliferating cells in a sterile labyrinthitis animal model. *Laryngoscope* 1998;108:651-6.

CRUZ OLM, MINITI A, COSSERMELLI W, OLIVEIRA RM. Autoimmune sensorineural hearing loss: a preliminary experimental study. *Am J Otol* 1990;11:342-346.

DEREBERY MJ, RAO VS, SIGLOCK TJ. Ménière's disease: an immune complex-mediated illness? *Laryngoscope* 1991;101:225-229.

ESTIVILL X, FORTINA P, SURREY S, RABIONET R, MELCHIONDA S, D'AGRUMA L et al.. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998;351:394-398.

FRIEDMANN I, ARNOLD W. *Pathology of the ear*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993

GARCIA BERROCAL JR, PINILLA UM, RAMIREZ CAMACHO R, GONZALEZ MF, LOPEZ CC. Patología del oído interno de probable origen autoinmune y su respuesta al tratamiento. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1995; 46:416-420.

GARCIA BERROCAL JR, RAMIREZ-CAMACHO R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J Laryngol Otol* 2000;114:101-107.

GARCIA BERROCAL JR, RAMIREZ-CAMACHO R, ARELLANO B, VARGAS JA. Validity of the western blot immunoassay for heat shock protein 70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope* 2002; 112: 304-309.

GARCIA CALLEJO FJ, MARCO AJ, MARTINEZ BMP, ORTS AMH, MORANT VA. Autoimmune identification of sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol.* 2003; 123(2):168-71.

GLODDEK B, ARNOLD G. Clinical and experimental studies of autoimmune inner ear disease. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002;548:10-14.

GLODDEK B, HARRIS JP. Role of lymphokines in the immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1989;108:68-75.

GOLDENBERG J, ASTRA E. Provas de atividade inflamatória. In: Guimarães RX; Guerra CCC, editors. *Clínica e laboratório*. São Paulo: Sarvier; 1983. p.435-40.

GRODZICKI RL, STEERE AC. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigens preparations for diagnosis of early Lyme disease. *J Infect Dis.*, v.157, p.790-97, 1988.

HARRIS JP. Immunology of the inner ear: response of the inner ear to antigen challenge. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1983;91:18-23.

HARRIS, JP. Immunology of the inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984;93:157-62.

HARRIS JP, RYAN AF. Immunobiology of the inner ear. *Am J Otolaryngol* 1984;5:418-25.

HARRIS JP, RYAN AF. Fundamental immune mechanisms of the brain and inner ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;112:639-653.

HARRIS JP, SHARP PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;100:516-524.

HARRIS JP, WOOLF NK, RYAN AF. Elaboration of systemic immunity following inner ear immunization. *Am J Otolaryngol* 1985;6:148-52.

HELFGOTT SM, MOSCICKI RA, SAN MARTIN J. Correlation between antibodies to type II collagen with treatment outcome in bilateral progressive sensorineural hearing loss. *Lancet* 1991;337:387-9.

HIROSE K, WENER MH, DUCKERT, LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope* 1999;109:1749-1754.

HORMAZÁBAL, W. Hipoacusia autoimmune. Reaccion autoimmune local? *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 1986,46(1):3-13.

HUGHES GB, BARNA BP, CALABRESE LH. Clinical diagnosis of immune inner-ear disease. *Laryngoscope* 1988a;98:251-253.

HUGHES GB, BARNA BP, KINNEY SE, CALABRESE LH, NALEPA NL. Predictive value of laboratory tests in "autoimmune" inner ear disease: preliminary report. *Laryngoscope*. 1986b;96(5):502-5.

HUGHES GB, BARNA BP, KINNEY SE, CALABRESE LH, HAMID MA, NALEPA NJ. Autoimmune endolymphatic hydrops: five-year review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988b;98:221-5.

HUGHES GB, KINNEY SE, BARNA BP. Practical versus theoretical management of autoimmune inner ear diseases. *Laryngoscope* 1984;94:758-67.

HUGHES GB, KINNEY SE, BARNA BP, CALABRESE LH. Autoimmune reactivity in Ménière disease: a preliminary report. *Laryngoscope*, 1983; 93(4):410-417.

HUGHES GB, KINNEY SE, HAMID MA, BARNA BP, CALABRESE LH. Autoimmune vestibular dysfunction: preliminary report. *Laryngoscope*. 1985; 95(8):893-897.

HUGHES GB, MOSCICKI R, BARNA BP, MARTIN JES. Laboratory diagnosis of immune inner ear disease. *Am J Otol* 1994;15:198-202.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 277: 680-5

LEHNHARDT E. Plotzliche horstorungen, auf beiden seiten gleichzeitig order nacheinander aufgetreten. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1958;37:1-17.

LOWRY OH, ROSENBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

MAZLUMZADDEH M, LOWE VJ, MULLAN BP, FABRY DA, McDONALD TJ, MATTESON EL. The utility of positron emission tomography in the evaluation of autoimmune hearing loss. *Otol Neurotol* 2003,24:201-4.

MCCABE BF. Auto-immune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;88:585-9.

MOGI G, LIM DJ, WATANABE N. Immunologic study on the inner ear: immunoglobulins in perilymph. Arch Otolaryngol 1982;108:270-5.

MONSELL EM. New and revised reporting guidelines from the committee on hearing and equilibrium. Otolaryngol Head and Neck Surg 1995;113:176-178.

MOSCICKI RA, SAN MARTIN JE, QUINTERO CH, RAUCH SD, NADOL JBJR, BLOCK KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. JAMA 1994;272(8):611-6.

NAIR T, RAPHAEL Y, COLAN D, PARRETT T, PERLMAN L, BRAHMBHATT V. Monoclonal antibody induced hearing loss. Hear Res 1995;83:101-113.

PETER JB, SHOENFELD Y. *Autoantibodies*. Amsterdam:Elsevier Science B. V.; 1996.

PLESTER D, SOLIMAN AM. Autoimmune hearing loss. Am J Otol 1989;10:188-92.

RAHMAN MU, POE DS, CHOI HK. Autoimmune vestibule-cochlear disorders. Curr Opin Rheumatol 2001;13:184-9.

RAMSHANKAR M, GIRIRAJAN S, DAGAN O, RAVI SHANKAR HM, JALVI R, RANGASAYEE R et al.. Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J Med Genet* 2003;40:e68

RAUCH SD. Clinical management of immune-mediated inner ear disease. *Ann N Y Acad Sci* 1997;830:203-10.

RAUCH SD, MOSCICKI RA, SAN MARTIN JE. Bovine temporal bone as a source of inner ear antigens. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:688-690.

RAUCH SD, SAN MARTIN JE, MOSCICKI RA, BLOCH KJ. Serum antibodies against heat shock protein 70 in Ménière's disease. *Am J Otol* 1995;16(5):648-652.

ROWLEY MJ, KAROPOULOS C. Heat shock protein autoantibodies. in: Peter JB, Shoenfeld Y, editors. *Autoantibodies*. Amsterdam:Elsevier Sciences B.V.; 1996. p.336-342.

SAMUELSSON AK, HYDÉN D, ROBERG M, SKOGH T. Evaluation of anti-hsp70 antibody screening in sudden deafness. *Ear Hear*. 2003;24:233-235.

SATOH H, FIRESTEIN GS, BILLINGS PB, HARRIS JP, KEITHLEY EM. Tumor necrosis factor- α , an initiator, and Etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope* 2002;112:1627-1634.

SCHIFF M, BROWN M. Hormones and sudden deafness. *Laryngoscope* 1974;84:1959-81.

SCHUKNECHT H, NADOL J. Temporal bone pathology in a case of Cogan's syndrome. *Laryngoscope* 1994;104:1135-1142.

SILVA NMAVM. Doença auto-imune da orelha interna: métodos diagnósticos imunológicos. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2000.

SOLIMAN AM. Immune-mediated inner ear disease. *Am J Otol* 1992;13:575-579.

STEARNS GS, KEITHLEY EM, HARRIS JP. Development of high endothelial venule-like characteristics in the spiral modiolar vein induced by viral labyrinthitis. *Laryngoscope* 1993;103:890-8.

TAKAHASHI M, HARRIS JP. Anatomic distribution and localization of immunocompetent cells in normal mouse endolymphatic sac. *Acta Otolaryngologica* 1988;106:409-16.

TAKASU T, HARRIS JP. Reduction of inner ear inflammation by treatment with anti-ICAM-1 antibody. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106(12):1070-1075.

TEKIN M, ARNOS KS, XIA SJ, OELRICH MK, LIU WZ, NANCE WE et al.. W44C mutation in the connexin 26 gene associated with dominant non-syndromic deafness. *Clin Genet* 2001;59:269-273.

TOMIYAMA S, HARRIS JP. The endolymphatic sac: its importance in inner ear immune response. *Laryngoscope* 1986;96:685-691.

TOMIYAMA S, HARRIS JP. The role of the endolymphatic sac in inner ear immunity. *Acta Otolaryngol* 1987;103:182-8.

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4356.

VIADA J, RIBALTA G, MARTIN RS, SEPULVEDA C. Resultados de la detección de anticuerpos anticocleares em diversas patologías de oído. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello 1993;53(1):7-14.

WINFIELD J, JARJOUR WN. Stress proteins, autoimmunity and autoimmune disease. Curr Top Microbiol Immunol 1991a;167:161-89.

YAMANOBE S, HARRIS JP. Inner ear-specific autoantibodies. Laryngoscope 1993;103:319-325.

YOO TJ, YAZAWA Y, TOMODA K, FLOYD R. Type II collagen-induced endolymphatic hydrops in guinea pigs. Science 1983;222: 65-67.