

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia – Otorrinolaringologia

**ESTUDO CONTROLADO DA FREQUÊNCIA DO AUTO-ANTICORPO ANTI-
HSP70 PELOS MÉTODOS DE ELISA E WESTERN BLOT EM PACIENTES COM
DOENÇA DE MÉNIÈRE**

Aluno: Anne-Rose L. Wiederkehr Baú

Orientador: Professor Doutor Luiz Lavinsky

Co-orientadora: Professora Doutora Cristina Bonorino

Dissertação de Mestrado

2006

Ao meu saudoso pai, Valdecir, dedico o meu respeito, carinho e admiração. Obrigada pela força e pela garra com que me ensinou a enfrentar as dificuldades da vida. O seu exemplo é presença, estímulo e saudade.

À minha mãe, Célia, que me ensinou os verdadeiros valores da vida – e também a ter coragem – o meu muito obrigada pela dedicação, doação, sensibilidade e amor. A você, que sempre me apoiou em todos os momentos, a minha admiração, amor e carinho.

Ao meu irmão, Alexandre, agradeço pela cumplicidade, companheirismo e amizade. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos inteligentes e pela sensatez. Receba o meu carinho e todo o meu afeto.

Ao meu avô, José Fridolin Wiederkehr, o meu saudoso respeito. A ele, que foi um exemplo de dignidade e honestidade em toda a sua vida, e que tanto ensinou aos seus netos, a minha carinhosa lembrança, com saudade e afeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lavinsky, agradeço pela orientação e ensinamentos durante todo o aprendizado na clínica otorrinolaringológica, que se traduziu num convívio muito produtivo para a minha formação. Obrigada também pela oportunidade de cursar o Programa de Mestrado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Receba a minha admiração, gratidão e reconhecimento.

À Profa. Dra. Cristina Bonorino, agradeço pela acolhida em seu laboratório e por ter sido a minha maior incentivadora desde a residência médica – tendo, portanto, um papel fundamental no meu ingresso neste Programa de Mestrado. A minha gratidão e admiração, também, pelo seu apoio e incentivo ao estudo e pesquisa. Obrigada pela orientação e pelo tempo dedicado a este trabalho.

Ao Dr. Gasparian de Filippo, agradeço o amor, carinho e compreensão. Obrigada pelo estímulo, pelo apoio e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos colegas do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) - Laboratório de Imunorreumatologia, especialmente Leonardo e Ingrid, obrigada pela competência, apoio, disponibilidade e auxílio durante a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Von Müllen, obrigada pelo incentivo na pesquisa em Reumatologia e Imunologia durante o período de graduação em Medicina, assim como durante a elaboração do trabalho de conclusão da residência médica. A ele, dedico a minha admiração e profunda gratidão.

Ao Prof. Dr. Nilo Pereira Luz, o meu respeito e gratidão. Muito obrigada, querido professor, por ter me ensinado a sempre duvidar do que parece ser a “verdade absoluta” em Medicina. E, também, por ter me ensinado a buscar novas formas de conhecimento através

do estudo e da pesquisa científica. Expresso ainda a minha admiração por sua dedicação aos alunos e pelo exemplo de amor à Medicina.

Aos médicos do Serviço de Alergia e Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a minha gratidão e reconhecimento pela amizade e incentivo. Em especial, ao Prof. Dr. Alfeu Tavares França, dedico a minha admiração pelo exemplo de professor e médico.

À Dra. Cláudia Rafaela Cecchin, a minha gratidão e carinho pela amizade, apoio e pelas palavras de estímulo durante a realização desta pesquisa, e a minha admiração pelo seu empenho e dedicação profissional.

Ao meu primo, Rodrigo Sérgio Wiederkehr, exemplo de pesquisador e profissional, minha gratidão pelo apoio, amizade e incentivo.

À Dra. Miriam Selbach, agradeço pelo incentivo, apoio e carinho.

Aos amigos da Força Aérea Brasileira do Hospital da Aeronáutica de Canoas, Rio Grande do Sul, Dr. Washington da Cunha, Dra. Ana Luiza Borba Almeida e senhor Helfer, a minha gratidão pelo apoio e incentivo.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia – Otorrinolaringologia, Helena B. Costa e Estela Maris E. Araripe, agradeço sinceramente a cordial disponibilidade e colaboração.

Ao senhor Juares Uve, muito obrigada pela colaboração e auxílio.

Aos pacientes, motivo de nossa vocação, todo o meu interesse, devoção e respeito.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO – DOENÇA E SÍNDROME DE MÉNIÈRE: CONCEITUAÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1. Epidemiologia da doença de Ménière	15
1.2. Genética da doença de Ménière.....	18
1.3. Etiologias prováveis	19
1.3.2. Alterações vasculares	22
1.3.3. Alergia	23
1.3.4. Otosclerose	25
1.3.5. Infecções.....	25
1.3.6. Trauma.....	26
1.3.7. Outras etiologias.....	27
1.3.8. Auto-imunidade.....	29
1.4. Fisiopatologia dos sintomas da DM	29
1.5. Manifestações clínicas da doença de Ménière.....	32
1.6. Imunopatologia da doença de Ménière.....	36
1.6.1. Função imune da orelha interna	36
1.6.2. Classificação da resposta imune – reações de hipersensibilidade	44
1.6.2.1. Reação tipo I.....	44
1.6.2.2. Reação tipo II	45
1.6.2.3. Reação tipo III	46

1.6.2.4. Reação tipo IV	47
1.6.3. Conceitos sobre a imunopatologia da DM	48
1.7. Métodos diagnósticos imunológicos	53
2. OBJETIVOS	60
2.1. Objetivo geral	Erro! Indicador não definido. 60
3. REFERÊNCIAS	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E CONCLUSÕES	73
4.1. Artigo em língua portuguesa	74
4.2. Artigo em língua inglesa	123
5. ANEXOS	170

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Pacientes segundo grupo e lateralidade	106
Tabela II. Pacientes segundo grupo e tempo de evolução da doença	107
Tabela III. Pacientes segundo grupo e tipo de disacusia	108
Tabela IV. Pacientes do grupo controle (DOI) segundo diagnóstico	109
Tabela V. Pacientes do grupo de estudo (DM) conforme diagnóstico	110
Tabela VI. Principais resultados para cada paciente individualmente	111
Tabela VII. Pacientes segundo grupo e ELISA	115
Tabela VIII. Pacientes segundo grupo e WB	116
Tabela IX. Pacientes segundo diagnóstico e ELISA	117
Tabela X. Pacientes segundo diagnóstico e WB	118
Tabela XI. Pacientes segundo VSG e ELISA	119
Tabela XII. Pacientes segundo VSG e WB	120

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP = adenosina trifosfato

AVC = acidente vascular cerebral

C3 / C4 = complemento frações 3 e 4

CD4 = células T *helper* auxiliares, reconhecem peptídeos do MHC II

CD4 CD45 RA = células T *naive*

CD4 CD45 RO = células T de memória

CD8 = células T citotóxicas, reconhecem peptídeos do MHC I

DAB = diaminobenzidina

DB = decibéis

DM = doença de Ménière

DNS = disacusia neurosensorial

DOI = doença da orelha interna

ELAM1 = molécula de adesão leucocitária ao endotélio

ELISA = ensaio imunoenzimático

FAN = fator antinuclear

FR = fator reumatóide

HLA = antígeno leucocitário humano

HLA DR = sub-regiões da molécula do MHC classe II

HLA-A2 e HLA-B44 A e B = lócus da molécula MHC I. Os números determinam a especificidade antigênica.

HLA-Cw7 = antígenos não oficiais: a letra “w” antecede o número.

HSP/HSC = *heat shock protein/heat shock constitutive protein*

ICAM/VCAM = molécula de adesão intercelular/vascular

Ig = imunoglobulina

IL = interleucina

Kd = kilodalton

KLH = *keyhole limpet hemocyanin*

Linfócito B = produz anticorpos, resposta imune humoral

Linfócito T = timo dependente, medeia resposta imune celular adquirida

LTT = teste de transformação de linfócitos

MALT = sistema imune das mucosas

MHC = complexo principal de histocompatibilidade

MIF = teste da inibição da migração de linfócitos

NK = *natural killer*

OI = orelha interna

PBS = *phosphate buffered saline*

PUCRS = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RAST = *radioallergosorbent test*

SDS = *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SE = saco endolinfático

SM = síndrome de Ménière

SMV = veia modiolar espiral

TDG = tolerância diminuída a glicose

Th1/Th2 = linfócitos T auxiliares do tipo 1 e do tipo 2

TTG = teste de tolerância à glicose

VSG = velocidade de sedimentação globular

WB = Western blot

RESUMO

Objetivos: Determinar a frequência de auto-anticorpos anti-HSP70 pelos métodos de ELISA e *Western blot* e comparar os resultados pelos diferentes métodos em pacientes com doença de Ménière (DM) e em pacientes com doenças da orelha interna (DOI) que não preenchiam os critérios para a DM.

Delineamento: Prospectivo, com delineamento do tipo caso-controle, em pacientes com DM e DOI não-Ménière.

Métodos: Amostras de sangue foram coletadas de 31 pacientes com DM e 78 pacientes com DOI não-Ménière e testadas para presença de anti-HSP70 com ELISA e *Western blot*. Foram obtidos dados sobre os sintomas cocleares e vestibulares.

Resultados: No grupo com DM, 93,6% dos pacientes tiveram um intervalo de tempo maior que um ano entre o início dos sintomas e a realização dos testes laboratoriais, predominando a doença unilateral (58,1%). O anti-HSP70 foi detectado por ELISA em quatro pacientes (12,9%) e por *Western blot* em oito (25,8%). Somente um paciente com o teste de ELISA positivo apresentava doença ativa. Quanto ao *Western blot* com resultado positivo, dois pacientes estavam com a doença ativa e seis, inativa. A análise estatística não estabeleceu qualquer associação entre os achados sorológicos e os fatores clínicos da DM. No grupo com DOI não-Ménière, a doença bilateral ocorreu em 64,1%. Não foi encontrada associação entre lateralidade, tempo de evolução e atividade da doença com auto-anticorpos anti-HSP70.

Conclusão: A detecção de auto-anticorpos anti-HSP70 por ELISA e *Western blot* não ocorreu em maior frequência em pacientes com DM do que em DOI não Ménière.

ABSTRACT

Objectives: To establish the frequency of anti-HSP70 autoantibodies using the ELISA and the Western blot methods and compare the results of each method in patients with Ménière's Disease (MD) or non-Ménière inner ear diseases (IED).

Study design: Prospective case-control study with patients with MD and non-Ménière IED.

Methods: Blood samples were collected from 31 patients with MD and 78 patients with non-Ménière IED and tested for the presence of anti-HSP70 using ELISA and Western blot. Data regarding cochlear and vestibular symptoms were collected.

Results: In the MD group, the onset of symptoms occurred more than one year before laboratory testing in 93.6% of the patients, with predominance of unilateral disease (58.1%). Anti-HSP70 was identified in four patients (12.9%) with ELISA and in eight patients (25.8%) with WB. Only one patient with positive ELISA result presented active disease. In Western blot-positive patients, two presented active disease and six presented inactive disease. Statistical analyses did not establish any association between serologic findings and MD clinical features. In the IED group, 64.1% presented bilateral disease. No association was found between disease laterality, duration and activity and anti-HSP70 autoantibodies.

Conclusion: The detection of auto-antibodies via ELISA or the WB did not take place at a higher frequency in the group of patients with MD than in the group of patients with IED.

1. INTRODUÇÃO – DOENÇA E SÍNDROME DE MÉNIÈRE: CONCEITUAÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Em 1861, durante uma conferência médica, Prosper Ménière descreveu pela primeira vez um conjunto de sintomas que até então eram atribuídos a uma condição cerebral definida como apoplexia cerebral (1). Conforme demonstrou Ménière, a doença, que recebeu o seu nome, era decorrente de alterações na homeostasia da orelha interna (OI), causando perda auditiva do tipo disacusia neurosensorial (DNS), episódios de vertigem com duração de 20 minutos até horas e zumbido na ausência de sintomas neurológicos ou seqüelas, permanecendo o paciente orientado e consciente (1,2). Ménière observou ainda que as orelhas externa e média dos indivíduos afetados eram normais. A doença de Ménière (DM) tem apresentação clínica variada, caracterizada por remissões e exacerbações, tornando o manejo difícil e muitas vezes frustrante (3).

Durante as décadas de 1920 e 1960, muitos pesquisadores descreveram achados histológicos semelhantes em estudos de ossos temporais de pacientes com DM (4-6). A histopatologia da hidropisia endolinfática foi descrita, pela primeira vez, por Hallpike e Cairns, na Inglaterra, e por Yamakawa, no Japão. Ambos os estudos foram publicados em 1938, relatando as alterações características no labirinto em ossos temporais associados à DM. Os achados, relatados de maneira independente pelos pesquisadores citados, enfatizavam a suspeita de que a DM era de caráter idiopático, estabelecendo a distinção entre a DM e a labirintite, descrita anteriormente por Wittmaack (4-7). Em 1950, Symmonds, um médico clínico geral, incluiu a plenitude aural como quarto sintoma da DM (3). Kimura, em 1967, comprovou em estudo experimental que a endolinfa, após ser produzida, movia-se em direção ao SE, e que a obstrução do fluxo poderia levar a hidropisia (8, 9).

Hidropisia endolinfática é um termo histopatológico que descreve uma alteração na OI decorrente da distensão progressiva do espaço endolinfático, especialmente do ducto coclear e sáculo, embora o utrículo e as ampolas dos canais semicirculares também possam estar envolvidas (9-12). Quando a causa de hidropisia não pode ser identificada, a desordem recebe o nome de DM, enquanto os casos com sintomas que podem ser atribuídos a causa conhecida são identificados como casos de síndrome de Ménière (SM) (13,14).

Assim como a DM, outras doenças da orelha interna (DOI), como surdez súbita e surdez progressiva (15), permanecem com a etiologia desconhecida (16). As evidências indicam a possibilidade de que uma reação imunológica oculta seja a causa dessas enfermidades. Ainda que a DOI imunomediada não seja reconhecida como uma entidade clínica (13,17-19), Yoo e cols. encontraram uma associação entre anticorpos anti-colágeno tipo II e a DM (20). Mas, apesar do grande número de pesquisas realizadas, alguns aspectos etiopatogênicos da DM, assim como a terapêutica ideal, permanecem indefinidos (9,14). A literatura sugere uma etiologia multifatorial, que inclui fatores ambientais e herança genética (4,14,21).

O interesse no estudo da OI renovou-se com o uso difundido dos implantes cocleares no tratamento da DNS incapacitante. A OI foi considerada segregada do sistema imune por estar isolada dentro da cápsula ótica e por não ter drenagem linfática. Entretanto, as pesquisas dos últimos 30 anos modificaram esse conceito (22). Um estudo recente de Yimtae e cols. encontrou evidências de que existe drenagem da OI, através da orelha média, para linfonodos cervicais superficiais, e que a OI tem conexões próprias com os linfonodos. Há evidências de que o SE tem vasos linfáticos que poderiam servir como via de drenagem para linfonodos regionais (23).

O SE está rodeado por vasos linfáticos, capilares fenestrados e vênulas, abrigando células imunocompetentes, linfócitos e macrófagos capazes de processar e apresentar antígenos. Além disso, a concentração e a produção local de anticorpos aumenta em resposta a estímulos antigênicos (22).

A etiopatogenia imunomediada foi descrita em pesquisas realizadas por alguns autores, que sugerem ser essa a causa de parte dos casos de DM classificados anteriormente como de etiologia idiopática (9,14,17,24,25). A dificuldade em estabelecer o diagnóstico de certeza da doença imunomediada persiste por não ser possível a retirada de amostras de tecido coclear para análise, diferentemente das doenças em que é viável a realização de biópsias.

O curso clínico da DM, com flutuações auditivas, períodos assintomáticos e oscilações na gravidade da doença, resultando em lenta e progressiva deterioração do órgão afetado, é semelhante ao observado em muitas doenças auto-imunes. Tais doenças são exacerbadas por estresse físico e psicológico, uma observação que também é válida para a DM (26,27). O diagnóstico precoce da DM é difícil em decorrência dessas características (1) e, na maioria das vezes, a DM é diagnosticada em estágios avançados (9). Entretanto, o diagnóstico precoce possibilitaria o manejo correto da DM, com chances de reverter ou controlar a progressão dos sintomas auditivos e vestibulares (17).

A elucidação etiológica das DOI, especificamente no estudo da DM, é uma tarefa árdua. Os estudos realizados têm o objetivo de modificar o conceito de DM como uma doença idiopática, incurável e debilitante, buscando um tratamento viável e eficaz, já que a possibilidade de um mecanismo imunomediado como fator causal reservaria a possibilidade de melhora ou cura com um tratamento imunossupressor. Vários estudos mostraram uma frequência maior de auto-anticorpos anti-HSP70 no soro de pacientes com DM em relação a controles (4,13,22,26,28-36); entretanto, esse auto-anticorpo não é

específico para os antígenos da OI, e o seu exato significado etiológico na DM ainda não foi estabelecido (37). Não está claro, por exemplo, se a reatividade ao HSP70 é um marcador de auto-imunidade ou se esse auto-anticorpo tem uma função na patogênese da DNS e da DM (38). A necessidade de determinar, através de um estudo controlado, se há associação entre a ocorrência de auto-anticorpos anti-HSP70 com a DM, em comparação com outras DOI, motivou a realização deste trabalho.

1.1. Epidemiologia da doença de Ménière

A idéia vigente entre muitos médicos clínicos gerais e pacientes é que tontura é sinônimo de labirintite e que é incurável. Por isso, muitas vezes, o diagnóstico e o tratamento são feitos de maneira errada.

Os dados sobre a epidemiologia da DM são controversos e escassos na literatura, apesar do grande número de pesquisas realizadas, anualmente, sobre a doença. A explicação para as dificuldades em desenvolver estudos epidemiológicos reside no fato de que grande parte dos estudos já realizados são retrospectivos, baseados na análise de dados coletados, em sua maioria, por médicos não otologistas.

Os dados publicados sobre prevalência e incidência da doença variam bastante. Em 1954, um estudo pioneiro foi realizado por Cawthorne e Hewlet na tentativa de definir a incidência da DM. Stahle, em 1978, também avaliou a incidência da DM. Ambas as pesquisas apresentaram grande variação nos resultados. A primeira, realizada na Inglaterra, encontrou 157 casos para cada 100.000 habitantes, enquanto que a segunda, realizada na Suécia, revelou uma incidência de 46 casos para cada 100.000 habitantes. Porém, falhas metodológicas comprometeram a validade dos estudos (9).

A dificuldade em estabelecer o diagnóstico da DM levou a Academia Americana de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, em 1972, a propor a padronização dos critérios diagnósticos (39). Tais critérios foram revisados em 1985 (40) e simplificados em 1995 (2). Nesse processo, houve um reconhecimento quanto à grande variação em termos dos critérios diagnósticos empregados em estudos anteriores, que muitas vezes incluíam casos de patologias cocleovestibulares chamadas de “*Ménière-like*”, que não deveriam fazer parte das casuísticas (2).

Durante o período de 1975 a 1990, três estudos populacionais foram realizados no Japão sobre a DM, revelando uma prevalência de 17 casos em cada 100.000 habitantes (41,42). Na Alemanha, entre 1974 e 1994, Haid e cols. constataram uma incidência de 2,9% de pacientes com diagnóstico de DM entre 20.000 exames vestibulares realizados em indivíduos com distúrbios do equilíbrio avaliados pela eletronistagmografia (43).

Um estudo controlado foi realizado em Rochester, Estados Unidos, para avaliar a incidência de DM no período de 1951 a 1980. Seguindo os critérios padronizados, os autores constataram uma incidência de 180 casos da DM nesses 30 anos (39). É importante ressaltar que os 180 casos com diagnóstico correto representavam 41,3% do grupo de pacientes que teve diagnóstico de DM antes da padronização dos critérios diagnósticos, sendo que 58,7% dos pacientes que anteriormente tiveram diagnóstico da doença não preencheram os critérios padronizados em 1972 (44). Em 1983, Watanabe publicou uma incidência de 50 a 350 pessoas com DM para cada 100.000 habitantes por ano em Tóquio, no Japão (45).

Kotimäki e cols. realizaram um estudo retrospectivo de prevalência da DM na população de cinco milhões de habitantes da Finlândia, analisando os pacientes tratados pela doença em hospitais no período de 1992 a 1996. A avaliação dos prontuários de acordo com os critérios revisados em 1995 (2) revelou que os casos de DM representavam

42,8% do grupo que fora previamente considerado doente. A prevalência encontrada na Finlândia foi de 43 pacientes para cada 100.000 habitantes (46). Um estudo realizado por Morrison revelou uma incidência de um paciente com DM para cada 2.000 habitantes (47) nos Estados Unidos.

Celestino e Ralli sugeriram que o número de casos diagnosticados como DM aumentou na proporção do aumento do acesso ao atendimento médico. Naito corrobora tais afirmações, e também ressalta que a mudança nos hábitos e estilo de vida do povo japonês, cada vez mais próximo do ocidental, fez crescer o número de casos da doença nessa população (9).

A DM ocorre na vida adulta, geralmente entre os 20 e 60 anos, sendo a idade média de início a quarta década de vida (43,48). Estima-se que aproximadamente 3% dos pacientes com DM tiveram perda auditiva desde a infância, que foi atribuída a doenças como caxumba, meningite ou trauma do osso temporal, manifestando-se somente na idade adulta com as características clínicas da DM (9,49).

Os dados relativos tanto ao sexo quanto à lateralidade são conflitantes. Alguns autores afirmam que a DM ocorre em homens e mulheres em proporção idêntica (43), com predominância da doença bilateral no sexo feminino (9). Paparella e cols. e Haid e cols. constataram que a DM afeta ambos os ouvidos com a mesma freqüência (9,43).

Além dos aspectos epidemiológicos relatados na literatura, é importante ressaltar que o caráter flutuante da DM dificulta a realização de estudos controlados confiáveis que avaliem a resposta ao tratamento da doença (50). As dificuldades aqui expostas provavelmente explicam o número reduzido de estudos sobre a prevalência e a incidência da DM.

Mesmo com a padronização dos critérios diagnósticos para a DM, uma metanálise de artigos com ênfase no diagnóstico e resposta ao tratamento da DM, publicados de 1989

a 1999, revelou que, embora 79,7% dos estudos seguissem os critérios diagnósticos preconizados, somente 39,8% estavam em conformidade com outras diretrizes da Academia Americana de Otorrinolaringologia. Os critérios diagnósticos da DM, de 1995, estabelecem que a resposta ao tratamento não deveria ser avaliada antes de um acompanhamento de pelo menos dois anos. É recomendado que os pesquisadores avaliem os pacientes por pelo menos quatro anos após o início do tratamento, já que tal período de seguimento torna o estudo mais confiável. Os artigos que não preencherem tais critérios de diagnóstico e seguimento são de pouca utilidade (51).

1.2. Genética da doença de Ménière

A DM é caracterizada pelo início tardio dos sintomas e por ocorrer principalmente em caucasianos. A evidência de predisposição genética da doença surgiu após estudos com membros de uma mesma família e com gêmeos acometidos pela DM, associado ao fator distribuição racial. Aproximadamente 7% dos pacientes com DM familiar têm um modelo autossômico dominante, com 60% de penetrância, e padrão genético da antecipação, no qual em geração sucessiva da família com a doença os sintomas serão mais intensos e o início mais precoce. A DM esporádica inicia em faixa etária mais avançada se comparada à doença familiar, que inicia em faixas etárias menores e parece acometer mais o sexo feminino. A DM esporádica não apresenta diferença entre os sexos, embora alguns autores relatem discreto predomínio no sexo feminino (47).

Foi descrita a associação da DM com enxaqueca e antígenos leucocitários humanos (HLA) (52). As moléculas de superfície celular, denominadas HLA, são codificadas pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em determinados haplótipos e estão associadas a uma variedade de doenças auto-imunes e órgão-específicas (12). Alguns

autores, como Koo e Koyama, encontraram associação entre DM e HLA-DR (14). A DM poderia decorrer de mutações no braço curto do cromossomo 6, onde se localiza o HLA; tais mutações seriam sinérgicas para o desenvolvimento da DM, segundo Arweiler. O mesmo autor encontrou a combinação de HLA-A2 e HLA-B44 em 60% dos 48 pacientes com história familiar positiva para a DM por ele estudados e em 37% dos pacientes com DM mas sem história familiar, contra 5% de prevalência na população em geral (53). Morrison e cols. avaliaram 70 casos da doença e identificaram o haplótipos A3-B7-CW7-DR2 como o mais comum (47). A incidência do haplótipos HLA-Cw7 estaria aumentada entre pacientes com DM, bem como entre pacientes com DOI de provável etiologia auto-imune (12,27,52,54). Entretanto, alguns autores contestam a associação do HLA com a DM (55).

Fransen e cols. encontraram associação entre os sintomas de DM em três famílias com uma mutação no gene COCH, fator genético que poderia contribuir para a DM (56). Recentemente, um estudo indicou que as mutações no gene COCH humano, que está localizado no cromossomo 14, levam a DNS ou DM. O COCH-5B2 seria o antígeno alvo dos anticorpos direcionados contra a OI (47). Paparella e cols. avaliaram 500 pacientes utilizando um questionário, encontrando uma prevalência de 20% de história familiar na DM (14).

1.3. Etiologias prováveis

A etiologia da DM é controversa. Acredita-se que a doença seja multifatorial. As evidências sugerem, como prováveis causas para a hidropisia endolinfática, trauma sobre o osso temporal ou trauma acústico (4,14), alterações metabólicas (15,57-62), processos infecciosos (4,49,59,63,64), otosclerose (4,14,20,59), alergia (12,27,65,66) e auto-imunidade (13,16,17,21,24,28,31,33-35,67-70) entre outras causas (4,14,59,71,72).

1.3.1. Alterações metabólicas

A compreensão dos processos metabólicos que produzem a disacusia deriva da associação entre a bioquímica e a genética (60). As estruturas labirínticas, principalmente a estria vascular, são sensíveis a mudanças nos níveis de glicose e oxigênio associadas ao metabolismo da insulina (59). A OI tem intensa atividade metabólica, mas, por não dispor de energia acumulada, está sujeita a alterações funcionais na ausência de glicose (15,61). A alteração no metabolismo dos carboidratos parece ser o distúrbio metabólico mais prevalente associado a manifestações clínicas variadas que incluem DNS flutuante ou progressiva, zumbidos e vertigem, representando assim pontos de um *continuum* de alterações na homeostase dos carboidratos. Portanto, sua pesquisa é fundamental no diagnóstico e tratamento desses pacientes (58,60).

Mangabeira Albernaz e Fukuda realizaram um estudo em pacientes com suspeita clínica de DOI de origem metabólica, submetendo todos os pacientes a curva glicêmica e insulinêmica de 5 horas. Eles constataram que o distúrbio era comum, com uma prevalência de 82% de alteração nas curvas. A hipoglicemia (um ou mais valores inferiores a 55 mg/dl) ou hiperglicemia ocorreram em 41% dos casos, ao passo que todos os pacientes apresentaram valores normais na glicemia de jejum. A anormalidade mais freqüente foi a hiperinsulinemia. Os pacientes que foram orientados a manter dieta com restrição de carboidratos, de rápida absorção, tiveram boa resposta, com controle bem-sucedido dos sintomas (73).

A hiperinsulinemia é a alteração mais precoce e consistente quando comparada à curva glicêmica no diagnóstico de DM de origem metabólica (61,73). A curva insulinêmica é mais sensível em comparação com a glicêmica por detectar precocemente as alterações no metabolismo dos carboidratos. Além disso, a curva glicêmica apresenta limitações, como a possibilidade de episódios de hipoglicemia entre as coletas, resultando

em teste falso-negativo. Em relação ao teste de tolerância à glicose (TTG) de 2 horas, a limitação reside no fato de que a maioria das hipoglicemias ocorre após a terceira hora. Portanto, as curvas glicêmica e insulinêmica de 5 horas com 100 g de glicose são obrigatórias na investigação de enfermidades com sintomatologia vestibulococlear (61).

Os resultados do estudo de D'Ávila e Lavinsky confirmam o número significativo de pacientes com diagnóstico sindrômico de DM na presença de dismetabolopatias dos carboidratos, que se dividem nas seguintes entidades clínicas (61):

- Hiperinsulinismo e euglicemia: o diabetes *in situ* ou oculto, assim chamado por preceder o diabetes melito em anos, é o estágio mais precoce da dismetabolopatia associada quase que exclusivamente com manifestações vestibulococleares, sendo diagnosticado somente pela curva insulinêmica de 5 horas.
- Hiperinsulinismo com tolerância diminuída à glicose (TDG): representa a etapa intermediária entre a anterior e a diabete melito. Acomete a OI e outros órgãos.
- Hiperinsulinismo com hiperglicemia: é o diabete melito com comprometimento de órgãos-alvo que não a OI.

A identificação do distúrbio metabólico como fator causal da DM possibilita a reversão ou o controle da progressão da DNS e dos sintomas vestibulares, desde que tratados a tempo (58,61,73).

A importância da investigação etiológica das DOI em pacientes com sintoma de zumbido foi documentada por Lavinsky e cols. Foi encontrada uma prevalência de 84 a 92% de hiperinsulinemia entre os pacientes com zumbido idiopático; houve melhora significativa com o tratamento da dismetabolopatia, com resolução dos sintomas de zumbido em 15% dos pacientes, fato que não foi observado com outros tratamentos (74).

As influências de fatores bioquímicos, metabólicos e hormonais e dos neurotransmissores começaram a ser estudadas. O controle hormonal, o sistema imune, o estresse e o processamento dos alimentos estão envolvidos no transporte de substâncias para o fluido da OI, após atravessar alguns obstáculos, dentre os quais a parede do tubo digestivo, a barreira hematoencefálica e o ducto e SE, que permitem a passagem das substâncias necessárias para o funcionamento da OI. As substâncias neurotransmissoras e seus respectivos precursores (serotonina do triptofano e dopamina e norepinefrina da tirosina), também provêm da dieta. A diminuição na concentração dos neurotransmissores pode causar sintomas da OI (62).

1.3.2. Alterações vasculares

As alterações circulatórias são decorrentes de patologias crônicas que provocam a diminuição do calibre das artérias e prejudicam a irrigação da OI pela artéria auditiva interna. As malformações vasculares, embolia, compressão externa por tumor, vasculites inflamatórias, aumento da viscosidade sangüínea, dislipidemia e hipertensão arterial, entre outras, podem causar DOI com sintomas otológicos e vestibulares (15).

Sabe-se que a dislipidemia pode induzir um quadro de hidropisia endolinfática característico de SM, por mecanismo desconhecido, não atribuído a vasculopatia aterosclerótica da OI. As principais formas de alteração do metabolismo dos lipídios, comprovadamente relacionadas à hipoacusia, são a hipercolesterolemia e as dislipoproteinemias, principalmente quando a hipoacusia é familiar ou hereditária. A hipertrigliceridemia tem papel indefinido nas DOI (60). Alguns estudos, entretanto, não observaram associação entre hiperlipoproteinemia e DM (57,58).

1.3.3. Alergia

O papel da alergia na DM foi descrito pela primeira vez em 1923 (12,27). Com uma incidência de 20% na população em geral, a alergia é a doença auto-imune mais comum. A reação alérgica a inalantes e a alimentos foi associada a hidropisia e sintomas de DM (27). Embora o mecanismo imunológico que envolve alergia e DM seja controverso, desde 1970 a melhora nos sintomas da doença tem sido associada ao controle dos sintomas alérgicos, através da dessensibilização (imunoterapia) a inalantes ou da dieta de eliminação na alergia alimentar (12). A imunoterapia efetiva induz alterações imunológicas com a produção de um anticorpo IgG antígeno-específico que age como bloqueador e que pode prevenir a degranulação de mastócitos (27). Keles e cols. encontraram uma prevalência de alergia mais alta entre os pacientes com DM do que no grupo controle (75).

Derebery investigou a associação entre a alergia e a DM e, em seus estudos, encontrou uma incidência maior de DM bilateral entre os pacientes alérgicos. Ele argumenta que os pacientes alérgicos, com história familiar de atopia, que associam a piora dos sintomas da doença com a ingestão de determinado alimento ou com alterações ambientais, provocando sintomas alérgicos concomitantes com as crises da DM, deveriam ser submetidos aos testes alérgicos, especialmente nos casos de DM bilateral. Segundo o autor, os pacientes com DM, em crise, que não respondem à terapêutica clínica e cirúrgica convencional para a doença, somente obtendo melhora da sintomatologia com o uso de corticosteróides, deveriam ser avaliados quanto à possibilidade de causa alérgica ou imunomediada (65).

O *radioallergosorbent test*, ou RAST, é um teste *in vitro* utilizado para detectar IgE sérica antígeno-específica. Utilizando esse teste, Howard encontrou positividade em cerca de 40% dos testes para inalantes entre pacientes com diagnóstico de DM sem doença em seios da face (66). O índice é significativamente superior aos 17% de positividade na

população em geral. Derebery e Brookes relatam níveis elevados de imunocomplexos circulantes em pacientes com DM, bem como em pacientes alérgicos com rinite e asma (27,76).

Há pelo menos três maneiras pelas quais a alergia pode levar à hidropisia endolinfática. Primeiro, os efeitos vasodilatadores da histamina ou outros mediadores podem afetar a capacidade de reabsorção do SE. O segundo mecanismo possível é a produção de imunocomplexos circulantes, tais como antígenos de inalantes ou alimentos, que se depositam em vasos fenestrados do SE, produzindo inflamação. O terceiro mecanismo seria decorrente de uma interação alérgica com um antígeno viral. Uma infecção viral na OI durante a infância, como caxumba ou herpes, poderia predispor a uma inflamação crônica que prejudicaria a função de absorção do SE. Quando houvesse estímulo à produção de fluido, como na presença de alterações na tireóide, disfunções hormonais, excesso de sódio ou sintomas alérgicos (que reiniciam na idade adulta), o SE não conseguiria manejar o excesso de fluido, o que resultaria em hidropisia (27).

O tratamento de pacientes com DM com anti-histamínicos é rotineiro pelo efeito anti-colinérgico, estabilizador do labirinto, proporcionado pelos mesmos. Porém, os anti-histamínicos não agem sobre a hidropisia. Acredita-se que a meclizina, um anti-histamínico usado no tratamento dos sintomas vestibulares, bloqueia a resposta vasodepressora à histamina preferencialmente à resposta anti-colinérgica (27). Alguns relatos sugerem que os anti-histamínicos sedativos são depressores vestibulares, podendo melhorar a vertigem, independentemente dos seus efeitos sobre os mediadores alérgicos (12). Entretanto, esse fato não foi devidamente comprovado; portanto, os anti-histamínicos devem ser reservados somente para o controle das crises labirínticas e alérgicas (27). Assim, o papel da alergia na DM ainda é controverso.

1.3.4. Otosclerose

A otosclerose pode levar ao mau funcionamento do SE e causar alterações nas características químicas da endolinfa e perilinfa (4,14). É possível que mudanças histopatológicas, como o estreitamento do ducto e do SE por fibrose no osso temporal com otosclerose, comprometendo o aqueduto vestibular, causem uma alteração na reabsorção da endolinfa (59). A perda auditiva condutiva, característica da otosclerose, estará associada a DNS, sintomas vestibulares e plenitude aural. A hidropisia pode ocorrer também em decorrência do dano cirúrgico ao labirinto membranoso durante a estapedectomia (4,14).

Yoo e cols. foram pioneiros ao associar a elevação dos anticorpos séricos para colágeno tipo II bovino com otosclerose e DM, sugerindo que os anticorpos poderiam estar envolvidos na patogênese da doença (20). Acredita-se que a otosclerose poderia levar ao dano imunológico da OI ou a uma alteração no balanço iônico da perilinfa e endolinfa, ocasionando prejuízo na absorção da endolinfa (59).

1.3.5. Infecções

As infecções por vírus, bactérias e protozoários podem causar DOI por mecanismos diferentes. As infecções por protozoários são raras (12). A labirintite pode ocasionar a destruição do neuroepitélio por isquemia, provocada por êmbolo séptico ou por trombo (64).

O vírus pode causar infecção das células sensoriais do órgão de Corti após a viremia, através da estria vascular. A resposta imune do hospedeiro e a quantidade de vírus inoculado determinarão a intensidade das manifestações clínicas (64). Alguns estudos sugerem que infecções virais comuns na infância, como caxumba e sarampo, podem predispor ao desenvolvimento de DM na vida adulta (9,49). Arenberg e cols. sugerem que

o vírus ou o seu equivalente imunológico atingiriam a OI através da membrana da janela redonda ou pela via hematogênica (64). A infecção viral também pode agir como mecanismo de gatilho para o dano imunológico na DOI (12).

As bactérias, como o *Treponema pallidum*, podem causar labirintite, agindo diretamente na OI (12). A hidropisia luética, que ocorre por infecção congênita, pode causar doença precoce no neonato, simulando o secundarismo da forma adquirida, ou ser tardia, não-infecciosa. Na sífilis adquirida, um terço dos pacientes com sífilis terciária não tratada sofre danos no labirinto. A perda auditiva é bilateral e lenta (59). A DM decorrente de processo infeccioso seria bilateral caso a disseminação do patógeno fosse por via hematogênica (63,64).

Quando o local de origem da infecção é a orelha média, por otite média, a doença acomete somente um ouvido. As toxinas decorrentes do processo infeccioso chegam ao espaço endolinfático através da janela redonda, podendo ocasionar alterações na pressão osmótica e, conseqüentemente, hidropisia endolinfática aguda (59,63,64). As toxinas teriam acesso ao espaço endolinfático através da membrana de Reissner, que, cronicamente, levariam ao desenvolvimento de uma labirintite serosa. A infecção em crianças pode comprometer o desenvolvimento do ducto e SE, além de ocasionar alterações na formação do triângulo de Trautmann (59). Paparella, em um estudo com ossos temporais, encontrou associação significativa entre a otite média crônica e a hidropisia endolinfática. O mesmo autor constatou que a hipocelularidade mastóidea comumente presente na otite média crônica é encontrada em pacientes com DM (59).

1.3.6. Trauma

O trauma físico ou acústico pode levar ao desenvolvimento de hidropisia e DM através das alterações bioquímicas e da disfunção celular que produz na absorção da

endolinfa (4,14,59). O trauma acústico com sons de alta intensidade (>150 dB) poderia levar a dano do sistema coclear e vestibular (59).

O trauma craniano físico ou cirúrgico é uma causa comprovada de hidropisia (49). Diversos autores sugerem que o trauma sobre o labirinto membranoso pode resultar em descolamento do epitélio dos órgãos sensoriais e elementos celulares do sáculo e utrículo, principalmente o que ocorre no osso temporal, envolvendo o aqueduto vestibular. O dano gera restos celulares que prejudicam a reabsorção de endolinfa e a sintomatologia costuma ocorrer meses a anos após o trauma (59). Quando o trauma é mecânico, sem evidência de fratura do osso temporal, o paciente pode apresentar sintomas decorrentes da concussão coclear ou vestibular, mas também sintomas posicionais decorrentes de cupulolitíase (59).

Segal e cols. avaliaram militares veteranos da força aérea de Israel com perda auditiva induzida por ruído ou por trauma acústico. Os autores não encontraram associação entre a surdez por exposição a ruído com subsequente surgimento da DM (77). A fístula perilinfática pode simular Ménière; contudo, a sintomatologia inicia imediatamente após o trauma, exigindo uma timpanotomia exploradora para o controle dos sintomas (59).

1.3.7. Outras etiologias

O óxido nítrico é um potente vasodilatador produtor de enzimas que tem sido considerado responsável pela regulação do fluxo coclear e neurotransmissão. Portanto, as mudanças que ocorrem na OI pela hidropisia na DM poderiam ser atribuídas a ele. Estudos experimentais revelaram que quando o óxido nítrico é sintetizado em excesso, alterações morfológicas, eletrofisiológicas e histológicas ocorrem nas células ciliadas, com diminuição do potencial endococlear, além de haver toxicidade direta na estria vascular (14).

A vasopressina é um hormônio que regula a homeostasia da água, aumentando a permeabilidade renal. Takeda e cols., em estudo experimental, provocaram hidropisia em cobaias após a administração desse hormônio por uma semana. Foi verificada a elevação nos níveis de vasopressina no sangue de doentes em crise de DM, de forma semelhante ao que ocorre em animais de experimentação (72).

A enxaqueca pode ter relação com a DM, em alguns casos. Foi encontrada associação maior entre enxaqueca em pacientes com a DM do que na população em geral. É possível que a artéria auditiva interna esteja envolvida no processo fisiopatológico vascular da enxaqueca, causando sintomas cocleovestibulares. Um estudo encontrou, em 60% dos pacientes com enxaqueca basilar e sintomas neurológicos, respostas calóricas reduzidas em uma orelha, sugerindo acometimento do órgão periférico (59).

A leucemia mielóide aguda, ou a crônica, na fase blástica, podem ocasionar lesão vestibulococlear decorrente da infiltração leucêmica pela viscosidade sangüínea aumentada. A alteração na perfusão microvascular pode, raramente, provocar distúrbio vestibulococlear na leucemia mielóide crônica (78).

A arterite das células gigantes é uma vasculite obliterativa das artérias extracranianas que pode prejudicar o suprimento sanguíneo do sistema nervoso central, levando a cegueira e complicações cerebrais se não for reconhecida precocemente. A apresentação atípica da doença com sintomas auditivos e vestibulares característicos da DM sugere que a vasculite pode ser uma das causas da síndrome de Ménière (59).

A síndrome do anticorpo antifosfolipídico foi aventada como possível causa de DOI, provavelmente decorrente de microtrombos nos vasos da circulação labiríntica. Mouadeb e cols. constataram elevação dos níveis desse anticorpo em pacientes com DM e DNS progressiva idiopática (71). Entretanto, é importante registrar que o estudo avaliou os anticorpos em uma única ocasião, e que a elevação transitória dos anticorpos

antifosfolipídicos não é considerada patogênica, podendo ocorrer inclusive em infecções virais. Portanto, são necessários estudos para que o dano provocado pelos auto-anticorpo seja melhor compreendido.

O hipotireoidismo primário ou secundário pode ser causa de hidropisia. O mecanismo etiopatogênico é desconhecido; contudo, os pacientes que fazem reposição do hormônio tireóideo controlam os sintomas da DM (59). As crianças com hipotireoidismo congênito têm maior prevalência de DNS bilateral severa e anormalidades nos testes vestibulares. Estudos experimentais observaram alterações no desenvolvimento cocleovestibular quando ocorre deficiência de hormônio tireóideo em fases precoces da vida. Pacientes com síndrome de Pendred, uma rara doença genética autossômica recessiva, em que há defeito na biossíntese dos hormônios tireóideos, podem apresentar DNS e deformidade da cóclea do tipo Mondini (60).

Alguns estudos relacionam DM com ansiedade, depressão e outros transtornos psiquiátricos. Contudo, é provável que a associação seja secundária, e não causal, devido às características da doença e da evolução incerta da doença (59).

1.3.8. Auto-imunidade

Este tema será desenvolvido em 1.6, Imunopatologia da DM.

1.4. Fisiopatologia dos sintomas da DM

A fisiopatologia da DM não foi ainda totalmente elucidada. A endolinfa é produzida na estria vascular. É aceito que o problema básico na DM é o acúmulo da endolinfa no SE, não havendo um distúrbio no fluxo, mas, sim, uma diminuição na reabsorção da endolinfa, levando à hipertensão endolinfática (4,14). O processo é lento. A

hidropisia pode levar anos para se desenvolver. O bloqueio no escoamento da endolinfa no SE é gerado por fatores químicos ou físicos que interferem na sua homeostasia (14).

Quando o SE não recebe endolinfa suficiente devido a uma obstrução, como na DM, ele produz glicoproteínas, que atraem, por gradiente osmótico, endolinfa em direção ao SE. Um hormônio chamado *saccin* (ainda sem tradução), que é um inibidor endógeno da reabsorção de sódio nos rins, aumenta o volume da endolinfa na cóclea (14,79,80). A endolinfa se acumula atrás da obstrução, e a restauração súbita do fluxo longitudinal inicia a crise de vertigem (14,79). Acredita-se que a endolinfa apresente um fluxo longitudinal lento e um fluxo radial rápido (14). O SE pode ser classificado como uma glândula endócrina, por apresentar células que sintetizam, secretam, absorvem e digerem proteínas (80).

Alguns estudos histológicos revelaram as características do osso temporal dos doentes. Os achados encontrados foram: alterações estruturais (diminuição) na pneumatização do osso temporal; estreitamento do aqueduto vestibular; deslocamento do seio lateral em direção anterior e medial; e desenvolvimento anormal do SE (14). Paparella e cols. avaliaram o SE de pacientes com DM durante procedimentos cirúrgicos. As principais alterações verificadas, além da dilatação do SE, incluíam osteoneogênese, fibrose e tecido de granulação, resultando em espessamento e contração da dura-máter, do triângulo de Trautmann e do SE (4). Gussen relatou que a drenagem venosa anormal pode alterar a quantidade da endolinfa (81). A hidropisia sacular, quando severa, também se estende para o canal semi-circular, podendo causar alteração na função normal da crista ampular, o que explicaria a vertigem posicional em pacientes com DM (14).

A ruptura da membrana de Reissner tem sido descrita como causa das crises na DM. Entretanto, um estudo de revisão de ossos temporais hidrópicos de pacientes com DM evidenciou rompimento da membrana em somente um terço dos pacientes. Estudos

histopatológicos revelaram que a ruptura é mais comum no ducto coclear, e não em estruturas vestibulares como o sáculo (14). Portanto, os episódios de crise da DM associados à tríade de sintomas vestibulares e cocleares ocorreriam se houvesse ruptura do ducto coclear e do sáculo, o que não foi confirmado na histopatologia. Os pacientes referem melhora dos sintomas quando a pressão cai, sugerindo que a ruptura de membranas alivia os sintomas, e não os provoca (4,82). Sperling e cols., comparando a histopatologia da hidropisia sintomática e assintomática, encontraram diferenças significativas, como a frequência de ruptura de membranas, observada em 38% dos pacientes sintomáticos e em somente 8% dos assintomáticos. Com base nesses dados, a melhor explicação para a produção da hidropisia e de seus sintomas seria a associação entre mecanismos químicos e físicos (14,82).

A DM tem etiologia multifatorial, como já descrito anteriormente, levando à hidropisia endolinfática e, conseqüentemente, aos sintomas da doença. Entretanto, os relatos de casos de pacientes com características clínicas de DM que, ao terem os seus ossos temporais analisados, não demonstravam hidropisia, sugerem que esses pacientes não apresentavam verdadeiramente a DM (6). Schuknecht e Gulya acreditam que uma fístula espontânea entre endolinfa e perilinfaria explicaria a ausência de sintomas. Rauch e cols. realizaram exames histológicos em ossos temporais de pacientes com história de DM. Eles constataram que a hidropisia endolinfática esteve presente em todos os pacientes com DM não atribuída a outras causas. Entretanto, alguns pacientes com hidropisia endolinfática idiopática não apresentavam sintomas de DM. O motivo da ausência de manifestações clínicas em alguns pacientes com hidropisia não é conhecido (6,59).

1.5. Manifestações clínicas da doença de Ménière

A tríade de sintomas da DM é constituída por sintomas vestibulares, auditivos e plenitude aural. Os sintomas vestibulares incluem crise de vertigem em mais de uma ocasião ou sensação de desequilíbrio, que pode durar desde 20 minutos até horas. A vertigem posicional pode ocorrer entre as crises da DM, bem como a sensação de perda de equilíbrio, geralmente provocada por movimentos bruscos da cabeça e dos olhos. Alguns pacientes apresentam crise súbita, um fenômeno raro, chamado crise de Tumarkin, em que ocorre queda repentina ao solo, sem perda de consciência. A associação com palidez, sudorese, náuseas ou vômitos é comum, e tais sintomas são os mais incapacitantes para os pacientes (1,2,9).

Os sintomas auditivos típicos são a perda auditiva progressiva e flutuante do tipo DNS em baixas frequências, associada a zumbido, plenitude aural e intolerância a ruídos. O fenômeno de diplacusia ocorre com a percepção distorcida do som, mais alto na orelha afetada do que na contralateral. Os estágios mais avançados da doença revelam padrões audiométricos diversos, comumente acometendo também as altas frequências, formando uma curva plana, sem flutuação, à medida que a audição deteriora. A chamada síndrome de Lermoyez caracteriza-se pela melhora da audição, que ocorre após a crise aguda (1,2,9). A plenitude aural está presente na maioria das vezes, mas alguns pacientes referem pressão na cabeça e até mesmo na região cervical (18).

O paciente com DM permanece orientado e consciente durante toda a crise e não apresenta sintomas neurológicos ou seqüelas (1,4). A ansiedade, bem como a ingestão excessiva de sódio ou carboidratos, podem ser fatores desencadeantes da crise (4,83). A maneira como iniciam as manifestações clínicas da DM varia entre os pacientes. Haid e cols. relataram que 27% dos pacientes com DM apresentaram, no início da doença, a tríade clássica (43). Outros estudos mencionam que 40% dos pacientes têm somente os sintomas

auditivos, antecedendo os sintomas vestibulares. Acredita-se que tal fato seja decorrente do desenvolvimento da hidropisia, que se inicia na parte inferior do labirinto e ducto coclear. É menos comum que os pacientes desenvolvam os sintomas vestibulares isolados, que precedem a sintomatologia completa da doença em meses ou anos (9).

Uma avaliação da duração e gravidade das crises de vertigem revelou que, para cada quatro pacientes avaliados, um tinha crises que duravam menos de 1 hora, dois apresentavam crises durante 1 a 2 horas e um permanecia em crise por mais de 2 horas (48). Katsarkas relatou que o tempo de duração das crises era constante e que, em metade dos pacientes, duravam menos do que 6 horas. Quanto à periodicidade, nos primeiros anos a variação na frequência das crises é muito grande, em média três ou quatro crises por ano. Após alguns anos, a oscilação no número de crises é muito discreta. A resposta calórica na orelha doente é variável, mas frequentemente diminui na primeira década de doença e depois estabiliza em 50% da função normal, não tendo relação com o grau de perda auditiva (84). Quanto à prevalência dos sintomas cocleares, Paparella e cols. encontraram DNS em 87,7% dos pacientes, zumbido em 91,1%, plenitude aural em 74,1%, intolerância ao ruído em 56% e diplacusia em 43,6% (48).

O estadiamento da DM foi proposto e descrito por Filipo e cols. O estágio prodromico (zero) é determinado por sintomas intermitentes de duração variável e precede o estágio I, em que o paciente apresenta a tríade sintomática. Os estágios de I a III se dividem como segue:

- Ia, caracterizado por flutuação auditiva;
- Ib, em que não ocorre flutuação auditiva;
- II, em que o paciente atinge a estabilidade caracterizada por ausência de vertigem; podem tornar-se sintomáticos e voltar ao estágio I ou ir para o III.

- III, em que há doença progressiva e incapacitante, com possibilidade de envolvimento da orelha contralateral (85).

No grau I, os sintomas impedem o trabalho em ambientes de risco. No grau II, somente é possível ao paciente exercer atividades sedentárias. No grau III, não é possível o exercício de nenhuma atividade remunerada (40).

A incidência de DM bilateral varia de 2 a 78% na literatura. Acredita-se que tal discrepância seja decorrente das dificuldades epidemiológicas na aferição dos dados clínicos pela variabilidade diagnóstica, que foi minimizada com a padronização dos critérios de diagnóstico da doença (2,9). Sugeriu-se que a DM deve ser considerada bilateral se a DNS na orelha contralateral for maior do que 15 dB, associada a zumbido e recrutamento auditivo. Alguns autores encontraram doença bilateral em um entre três pacientes e DNS na orelha contralateral em 76% dos pacientes (9).

Um estudo recente de Peres revelou que 5% dos pacientes tinham DM bilateral, e 16% dos pacientes apresentaram DNS isolada acima de 25 dB na orelha contralateral (86). Haid e cols. relataram que 12% dos pacientes apresentavam doença bilateral (43). Entretanto, muitos autores acreditam que a doença bilateral é muito mais freqüente do que previamente se pensava (9). Os pacientes com DM bilateral devem ser acompanhados periodicamente pelo risco de desenvolver quadros mais graves e apresentar etiopatogenia imunológica. Derebery relatou uma incidência de 40% de DM bilateral entre os pacientes alérgicos, maior do que em não alérgicos (65). Alguns autores sugerem associação entre a positividade no teste de auto-anticorpos anti-HSP70 com DM bilateral (54,65,87).

Conforme mencionado anteriormente, a DM pode apresentar-se de maneira típica, em que o paciente desenvolve a tríade de sintomas, ou atípica, com sintomas cocleares ou vestibulares antecedendo a tríade sintomática completa. A DM coclear caracteriza-se pela

ausência de sintomas vestibulares. A DM vestibular ocorre com episódios de vertigem e plenitude aural sem surdez (9).

A doença ativa pode ter um curso progressivo e incapacitante em um de cada quatro pacientes. Nesses casos, ocorre piora dos sintomas, apesar do tratamento com diuréticos e restrição dietética (48). O labirinto membranoso pode ser destruído com a evolução natural da doença, tornando as crises menos incapacitantes (14). A curva audiométrica de DNS em baixas frequências, nos estágios precoces, e o acometimento de todas as frequências em intensidade semelhante (curva audiométrica horizontal), que ocorre com a evolução da doença, associados à hipoatividade do labirinto envolvido na eletrônístagmografia, são características da doença (2,9).

A DM é caracterizada por remissões e exacerbações que dificultam a avaliação de qualquer tratamento. As publicações prévias sobre o tratamento da DM apresentam dois problemas: a falta de um grupo controle que represente a história natural da doença e a ausência de critérios padronizados para avaliar a resposta ao tratamento. Silverstein argumenta também que, em sua experiência, uma proporção significativa de pacientes têm remissão espontânea dos sintomas vestibulares após um período de tempo (88).

Alguns trabalhos enfatizam uma questão polêmica: comparar o tratamento cirúrgico *versus* o tratamento clínico da DM. Um estudo de Silverstein e cols. comparou um grupo de pacientes submetido a procedimentos cirúrgicos no tratamento da DM a um grupo de pacientes que se negou a realizá-los e optou pelo tratamento clínico, que representa a história natural da doença. Em tal estudo, todos os pacientes foram avaliados por um mesmo questionário (baseado nos critérios diagnósticos da DM) (40). O grupo que foi submetido a cirurgia foi acompanhado por seis meses antes do procedimento cirúrgico. Os resultados obtidos em relação a DNS e vertigem foram comparados aos resultados do seguimento pós-operatório (reavaliação em seis, 24 e 36 ou mais meses) (88). O grupo que

realizou o tratamento clínico foi avaliado por questionário nos mesmos intervalos. O grande sucesso dos procedimentos cirúrgicos destrutivos (labirintectomia e neurectomia vestibular) no controle dos sintomas é conhecido, mas a indicação de tratamento por procedimentos para alívio da hidropisia (descompressão do SE e cocleasaculotomia) foi questionado, já que os índices de melhora clínica encontrados com o tratamento cirúrgico para hidropisia foram semelhantes aos do tratamento conservador (remissão espontânea) (6,88).

1.6. Imunopatologia da doença de Ménière

1.6.1. Função imune da orelha interna

O sistema linfóide dos mamíferos, através do tecido linfóide periférico, rico em vasos linfáticos e linfócitos, promove a vigilância contra organismos invasores ou proteínas estranhas (89). O cérebro, os testículos, a tireóide e a câmara anterior do olho são considerados sítios imunológicos privilegiados, bem como a OI (90). Recentemente, tornou-se claro que tais sítios não são determinados somente pelo isolamento em relação a imunidade sistêmica, que é imperfeito, mas pela capacidade de controlar a resposta inflamatória gerada pela reação imune com a finalidade de proteger os tecidos do dano (91).

As barreiras hematoencefálica e hematolabiríntica tornam ambos os órgãos imunoprivilegiados pelo isolamento imunológico e pela proteção contra os efeitos da imunidade sistêmica (89,91). Em relação ao cérebro, o fato que corrobora essa idéia é que o cérebro mostra uma reação de rejeição fraca aos tecidos transplantados. O cérebro não tem uma rede de linfáticos estabelecida (91).

Um estudo recente revelou evidências de que existe drenagem da OI, através da orelha média, para linfonodos cervicais superficiais. A OI difere do cérebro por apresentar conexões próprias com os linfonodos. Além disso, o SE tem vasos linfáticos que poderiam servir como via de drenagem para linfonodos regionais (23).

O tecido cerebral não dispõe de um complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e estaria inapto a participar de respostas imunes que envolvam a apresentação de antígenos a linfócitos T. Contudo, células gliais expostas ao interferon gama, que é uma interleucina (IL), podem expressar o MHC. O cérebro apresenta resposta sistêmica celular e humoral e, sob circunstâncias que exijam resposta imune, como em neoplasia e infecções, a imunossupressão local e a barreira hematoencefálica podem ser transpostas. Contudo, a inflamação resultante pode ter conseqüências negativas. A OI parece ser mais imunorresponsiva do que o cérebro, já que os antígenos apresentados na cóclea têm acesso rápido à imunidade sistêmica (91).

Harris demonstrou, em estudo experimental, que a OI, ao ser exposta a um antígeno inoculado dentro do espaço perilinfático, desenvolve uma resposta imune com anticorpos séricos antígeno-específicos. Porém, o estudo não determinava se o aumento dos anticorpos era por produção local ou por aumento da permeabilidade a imunoglobulinas séricas. Posteriormente, ele avaliou a capacidade da OI de desenvolver uma resposta imune específica a antígenos locais, que foi comprovada pelo aumento de anticorpos na perilinfa, independentemente dos níveis séricos de anticorpos, ou seja, da imunidade sistêmica. Os níveis de anticorpos no liquor eram menores do que os encontrados na perilinfa. Portanto, o liquor não é a origem dos anticorpos da OI, cujo sistema imune é independente (89).

Em 1985, Harris comparou o desenvolvimento da imunidade celular e humoral mediante a introdução de um antígeno dentro do peritônio e das orelhas interna e média em animais de experimentação. A OI e o peritônio apresentaram aumento de anticorpos

durante três semanas. Já a orelha média revelou uma resposta transitória e fraca por até duas semanas. O desenvolvimento de resposta imune celular no grupo que recebeu o antígeno intraperitoneal ocorreu em duas semanas e foi mais precoce e intensa, provavelmente devido à resposta dos vários órgãos linfóides intraperitoneais (baço, fígado, linfonodos do peritônio e placas de Peyer). O grupo que recebeu o antígeno na OI teve uma resposta imune celular menos intensa, entre a segunda e a terceira semanas, mas demonstrou células T sensibilizadas. A orelha média não desenvolveu imunidade celular a antígenos, mas poderia desenvolver uma resposta imune se fosse estimulada com uma carga imunogênica suficientemente grande (90).

Um estudo posterior, realizado pelo mesmo autor, com um modelo experimental em muitos aspectos similar à otite média aguda em humanos, demonstrou que os antígenos presentes na orelha média atravessavam a janela redonda e provocam a produção de anticorpos dentro da OI. A fixação de complemento poderia levar à liberação de mediadores, processo inflamatório e dano tecidual. A elevação no nível de anticorpos na perilinfa pode causar distúrbio na homeostase coclear, fato que poderia explicar a DNS decorrente da otite média crônica. Entretanto, os anticorpos na perilinfa poderiam proteger a OI dos patógenos durante um episódio de otite média. A extensão da resposta imune na doença e na defesa coclear da OI precisa ser melhor definida (92).

O estudo das DOI e do envolvimento imunomediado do órgão periférico vestibulococlear em humanos torna-se difícil pela impossibilidade de acesso à OI sem destruir a sua função. O diagnóstico de doenças associadas à deposição de complexos imunes circulantes, fixando complemento e ativando mediadores inflamatórios que causam dano tecidual de múltiplos órgãos, não é difícil. Um exemplo disso é a síndrome de Cogan, uma doença sistêmica com disfunção vestibulococlear. Entretanto, o papel da imunidade nas doenças idiopáticas que afetam a OI é desconhecido (89).

Os antígenos podem atingir a cóclea e estimular o sistema imune por vias diferentes. Os principais acessos à cóclea são através dos fluidos que irrigam o labirinto pela via hematogênica, por extensão no sistema nervoso central via meninges ou nervo auditivo, por propagação via liquor ou através das janelas oval e redonda na infecção da orelha média (22).

Experimentos em que o antígeno é inoculado dentro do espaço perilinfático mostraram que a OI é um sítio primário de resposta imune. O antígeno desencadeia a produção local de anticorpos, bem como o desenvolvimento de anticorpos séricos antígeno-específicos (90). Os complexos antígeno-anticorpo (IgG e IgM) presentes na perilinfa são fixadores de complemento e podem ativar a cascata do complemento com a liberação de substâncias vasoativas (22,89).

O SE, um órgão não-sensorial responsável pela homeostase da OI (27), está situado em uma cavidade óssea na superfície posterior do osso petroso e, parcialmente, entre as camadas de dura-máter na fossa craniana posterior (9). As principais funções do SE são: regular o volume e pressão da endolinfa, gerar a resposta imune da OI e eliminar materiais de origem celular, que são produtos da fagocitose. A manutenção do volume e da composição eletroquímica da endolinfa é essencial para a transformação dos estímulos físicos auditivos (sons) e vestibulares (acelerações) em mensagens nervosas (transdução mecano-bio-elétrica) (89). A energia necessária para o transporte iônico, que mantém os potenciais elétricos e promove a manutenção da estrutura celular, provém do metabolismo oxidativo (60). A resposta inflamatória e o desenvolvimento de imunidade local na OI dependem da integridade do SE (27). As anormalidades na composição, volume e pressão da endolinfa, rica em potássio, que é neurotóxico, induzem a surdez e/ou alterações no equilíbrio, características da DM (27, 93).

Estudos experimentais em que o SE foi obliterado cirurgicamente demonstraram redução da resposta imune e do dano coclear. O SE está envolvido por uma rede rica em vasos linfáticos, capilares fenestrados e vênulas, sendo a única estrutura da OI a conter células imunocompetentes, linfócitos e macrófagos capazes de processar e apresentar antígenos no estado basal, além de produzir imunoglobulinas no local (22,89). A presença de IgA secretora e de diferentes subpopulações de linfócitos caracteriza o SE como tecido linfóide associado às mucosas. Gloddek sugeriu que o tecido linfóide da nasofaringe poderia ter função na origem de células imunocompetentes do SE (22). As imunoglobulinas IgM, IgG e IgA estão presentes no SE e na perilíngua na concentração de 1 para 1.000 do título presente no soro, nível semelhante ao do líquor (22,27). Dornhoffer e cols. verificaram a deposição de IgG em 40% das amostras coletadas do SE durante procedimentos cirúrgicos em pacientes com DM (94).

O SE contém linfócitos, ao contrário da cóclea. O acúmulo de leucócitos e a produção local de imunoglobulinas na OI depende da migração de leucócitos da corrente sanguínea, facilitada pela liberação de mediadores da resposta imune com a interleucina 2 (IL2). Essa resposta ativa as células endoteliais da veia modiolar espiral (SMV), potencializando a expressão das moléculas de adesão 1 (ICAM1), que recrutam leucócitos da corrente sanguínea (22).

O *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) é um imunógeno que requer a cooperação das células T para gerar uma resposta humoral (90). É possível o desenvolvimento de labirintite estéril em ratos previamente sensibilizados a essa substância pela inoculação de KLH dentro da escala timpânica (resposta imune secundária). A indução de labirintite através de resposta imune secundária foi acompanhada pelo aumento de ICAM1, que tem um papel fundamental nas reações imunes, pois sua presença no epitélio do SE e no tecido conectivo peri-sacular é a evidência de sua participação na resposta imune da OI. Da

mesma forma, foi possível induzir a labirintite viral (por citomegalovírus), confirmando o papel da SMV no recrutamento de linfócitos e células NK da circulação sistêmica em direção à OI, através das moléculas de adesão (ICAM1, VCAM1, ELAM1) expressas na superfície das células endoteliais da SMV. Assim, o dano tecidual poderia ser prevenido pelo bloqueio do fluxo de células inflamatórias através de anticorpos contra moléculas de adesão (22).

Algumas características fazem do SE um sítio potencial para dano imunológico. Os capilares do SE têm um espaço subepitelial altamente vascularizado, contendo numerosos vasos sanguíneos fenestrados, diferentemente dos capilares da cóclea. Os vasos fenestrados são freqüentemente encontrados em órgãos envolvidos na absorção de líquidos, por isso são mais permeáveis e passíveis à deposição de complexos imunes. Além disso, são relativamente hiperosmolares em comparação ao soro. Essa característica de hiperosmolaridade aumenta a concentração local e facilita a deposição de imunocomplexos (27,95).

Takahashi e Harris investigaram, por métodos imunohistoquímicos, o desenvolvimento de células imunocompetentes em ratos, nos quais utilizaram KLH para gerar imunização na OI via espaço perilinfático e imunização sistêmica por injeção subcutânea. Após um período de três semanas, foram encontrados plasmócitos produtores de IgG, seguidos de IgM e IgA, observadas na resposta tardia (96). Como os autores não examinaram o epitélio do SE para a presença de componentes secretores da IgA, não puderam confirmar a presença do sistema imune das mucosas (MALT), como foi sugerido por Arnold e cols. (87). Contudo, o estudo revelou, na cóclea e SE, aumento de macrófagos e granulócitos após seis horas, atingindo um pico em três dias, momento a partir do qual começaram a declinar. Os macrófagos são conhecidos por promover a proliferação de células T e B através da liberação de IL1, e o predomínio de tais células na cóclea e SE

sugere que elas são a primeira linha de defesa e ativação da resposta imune na OI. Os linfócitos T helper, importantes na proliferação de células T e B estimuladas através da IL2, aumentaram gradualmente desde o primeiro dia após o estímulo com KLH até atingirem um platô em duas a três semanas, enquanto que os linfócitos T supressores surgiram somente após três semanas, no momento que decrescem os níveis de anticorpos, sugerindo o seu envolvimento na supressão da resposta imune (96).

A imunidade sistêmica é importante na defesa da OI. Recentemente, Mogi e cols. examinaram o nível de imunoglobulinas no soro, perilíngua e líquor. Eles constataram que os anticorpos séricos eram transferidos para a perilíngua numa concentração duas a quatro vezes maior do que a do líquor (89). O primeiro contato do antígeno com o sistema imune desencadeia uma resposta imune sistêmica primária (imunização). Harris avaliou animais de experimentação que foram previamente sensibilizados com citomegalovírus por via sistêmica e tiveram a função da OI preservada ao serem re-expostos a citomegalovírus vivos dentro da OI, mostrando que a imunidade sistêmica é importante na defesa da OI e que a apresentação de antígenos na OI contribui para a sua própria defesa (90).

O fenótipo dos linfócitos séricos em pacientes com surdez súbita foi estudado por citometria. Os pacientes mostraram diminuição de células T *naive* (CD4RA). A anormalidade poderia ser explicada pela presença de anticorpos contra CD4RA, como ocorre em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, pela conversão para células de memória CD4RO, em consequência do estímulo imunológico contínuo, como ocorre na esclerose sistêmica, ou por infecção viral. Uma hipótese alternativa seria a atração dessas células por sítios inflamatórios (97).

Os mecanismos imunológicos da OI são reações de hipersensibilidade do tipo II, de anticorpos contra antígenos teciduais, ou do tipo III, de complexos imunes circulantes mediados por IgG ou IgM (14). Utilizando WB, Filipino e cols. encontraram a presença de

auto-anticorpos, característicos da reação tipo II, contra estruturas da OI, em 20% dos soros de pacientes com DM (98). Harris descreveu produção local de anticorpos no saco endolinfático, sugerindo que existe imunidade humoral local na OI (89,90,99). Brookes constatou um aumento na incidência de complexos imunes circulantes em 55% dos pacientes com DM (76). O aumento dos níveis de complexos imunes circulantes tem sido descrito na DM (27,100). Derebery observou, em 26 de 30 pacientes com DM, um índice de complexos imunes circulantes que superava em três desvios padrão o índice observado para o grupo controle (100).

O colágeno tipo II, localizado por imuno-histoquímica na estria vascular, no limbo, ligamento espiral e órgão de Corti, permanece normalmente isolado do sistema imunológico e da circulação (101). Entretanto, se ocorrer ruptura desse mecanismo, uma reação imunológica por auto-anticorpos poderia ter participação na etiologia de DOI. Muino e cols. demonstraram, através da técnica de ELISA, que 22 de 27 pacientes com DM apresentavam IgG específica anti-colágeno tipo II, sugerindo um processo inflamatório crônico auto-imune relacionado ao colágeno tipo II como causa da DM. O colágeno tipo II poderia ser um marcador de gravidade e cronicidade do processo (102). Estudos experimentais de Yoo e cols. sugerem que o colágeno tipo II pode ser agente etiopatogênico na DM (101). Por outro lado, Harris e cols. não confirmaram que o colágeno tipo II induz a auto-imunidade (103). Portanto, é possível que esses auto-anticorpos representem um epifenômeno que, associado a outros fatores, como cirurgia otológica prévia ou infecção viral, poderia causar dano e, portanto, não estaria necessariamente relacionado à etiologia da doença (89).

Os antígenos expostos geram uma resposta imune. As células apresentadoras capturam os antígenos e levam-nos ao SE, onde são apresentados ao linfócito T, juntamente com o MHC de classe II. Os auto-anticorpos IgG anti-colágeno tipo II fixam

complemento, recrutam células inflamatórias que liberam mediadores e geram o dano tissular. Yoo e cols. acreditam que o colágeno tipo II seria a estrutura com maior capacidade antigênica do labirinto membranoso (101).

A estria vascular e a região subepitelial do ducto e SE têm capacidade de reagir imunologicamente quando estimuladas por antígenos, tornando o labirinto membranoso um órgão imunocompetente (89, 90, 92, 96, 101, 104). Há quatro tipos de reação de hipersensibilidade, segundo Gell e Coombs, que poderiam envolver a OI e causar manifestações diferentes de DOI (95).

1.6.2. Classificação da resposta imune – reações de hipersensibilidade

1.6.2.1. Reação tipo I

É a reação de resposta imune denominada reagínica, mediada por IgE, de caráter genético ou adquirido. A elevação da IgE é decorrente do desequilíbrio dos linfócitos regulatórios T auxiliares e supressores, pela depressão funcional dos linfócitos supressores. O antígeno induz a diferenciação das células T CD4 auxiliares em células T efectoras T_H2 que produzem IL-4 e das células B específicas para aquele antígeno em células produtoras de IgE. O antígeno (alimentar ou inalável, provindo de drogas ou venenos de insetos himenópteros), quando reintroduzido, liga-se a duas moléculas de IgE fixadas ao mastócito sensibilizado, desencadeando uma série de eventos intracelulares que liberam mediadores químicos dos grânulos dos mastócitos e basófilos sensibilizados. Entretanto, qualquer célula com receptores para IgE de baixa afinidade, como os eosinófilos e neutrófilos, pode sofrer degranulação, se corretamente estimulada. Os mastócitos, nos tecidos, e os basófilos, na circulação sanguínea, possuem receptores de alta afinidade para a fração Fc de IgE, fixando-se nesses receptores e iniciando os eventos de transdução de sinais em mastócitos

e basófilos que resultam na liberação de mediadores pré-formados no citoplasma dessas células, induzindo a reação imediata (vascular e dos músculos lisos) (105,106).

Outros mediadores químicos estimulam o influxo dos leucócitos, resultando na reação de fase tardia, na qual o eosinófilo tem papel importante (105,106). Os mediadores dividem-se em pré-formados e neoformados. Os pré-formados são: histamina, triptase, quimase, proteína básica principal e proteína catiônica eosinofílica. Os mediadores neoformados são: fator ativador de plaquetas, leucotrienos (C_4 , D_4 , E_4), prostaglandinas D_2 , fator quimiotático para neutrófilos, fator quimiotático para eosinófilos e citocinas produzidas sob ativação. Tais mediadores, ao serem liberados, provocam contração de músculos lisos, vasodilatação, aumento da permeabilidade na microcirculação, hipersecreção glandular e quimiotaxia de células inflamatórias, podendo causar dilatação dos vasos fenestrados no SE e também facilitar a deposição de imunocomplexos. A reação do tipo I como causa de dano à OI é possível, tendo sido relatada por Stahle e Derebery, mas ainda não existem evidências experimentais convincentes associando a reação de hipersensibilidade tipo I com DOI (27,95).

1.6.2.2. Reação tipo II

É a reação denominada citotóxica, na qual os antígenos localizam-se nas superfícies de células como hemácias e plaquetas, às quais se ligam as imunoglobulinas IgG e IgM. Tais imunoglobulinas podem atuar de maneiras diferentes: como opsoninas, principalmente a IgG, facilitando a fagocitose (neutrófilos e monócitos) contra a célula-alvo; como anticorpos IgG e IgM, ativando o sistema complemento, levando à lise celular; e como anticorpos IgG, provocando citotoxicidade dependente de anticorpo. Neste último caso, as imunoglobulinas se ligam aos antígenos pela fração Fab, deixando livre a fração

Fc, à qual se ligará uma célula citotóxica, como um linfócito T CD8 ou uma célula NK, levando à lise celular (105,106).

Os principais exemplos clínicos dessa reação de hipersensibilidade incluem incompatibilidade sangüínea, anemia hemolítica, trombocitopenia e agranulocitose decorrente de reação a drogas, trombocitopenia secundária à alergia ao leite de vaca e enfermidades auto-ímmunes como a síndrome de Goodpasture (105,106). Soliman encontrou 34% de reatividade a auto-anticorpos no soro de pacientes com DM. Harris e Sharp, bem como Yoo e cols., constataram que a auto-ímmunidade por colágeno tipo II pode ter significância etiológica na DM, embora o seu papel ainda não seja conhecido (16,95,101).

1.6.2.3. Reação tipo III

Representa as doenças mediadas por complexos ímmunes que ocorrem com a união de antígenos solúveis e anticorpos das classes G e M, levando à formação de ímmunocomplexos que podem ser pequenos, médios ou grandes. Os complexos médios são os mais patogênicos e se depositam nos vasos menos calibrosos e em locais de grande turbulência e filtração sangüínea, como os glomérulos renais, articulações e pele. Quando se depositam no endotélio vascular, ativam o complemento, gerando produtos biologicamente ativos, como anafilotoxinas e quimiotaxia para neutrófilos (105).

As lesões vasculares podem ser localizadas, como na reação de Arthus, ou autolimitadas, se o antígeno for eliminado, como na doença do soro e reações a drogas (105,106). As lesões podem se perpetuar caso ocorra deposição continuada de ímmunocomplexos, ocasionando processo inflamatório, como nas doenças auto-ímmunes, nas quais os complexos ímmunes são de tamanho médio (106).

Os estudos de Derebery e Brookes revelaram níveis elevados de complexos ímmunes no soro de pacientes com DM (27,76). Dornhoffer e cols. (94) demonstraram, em pacientes

submetidos a cirurgia por DM, deposição de IgG em 40% dos SE (95). Em seguida, conduziram um estudo para avaliar se a DM era uma reação do tipo II ou III, e a maioria dos pacientes apresentou uma reação não específica do tipo III. Os resultados foram semelhantes aos de Futaki e cols. e Yazawa e cols.

1.6.2.4. Reação tipo IV

Ao contrário das reações de hipersensibilidade previamente descritas, a reação de hipersensibilidade tardia caracteriza-se por ser mediada por células. O antígeno se liga à superfície das células alvo e é reconhecido por linfócitos T_H1 específicos sensibilizados por um contato prévio com o antígeno. Os peptídeos ou os haptenos são apresentados através do MHC de classe II das células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T_H1 , que se ativam e liberam interleucinas e moléculas de adesão. As células inflamatórias levam à alteração da permeabilidade vascular, migração de mais células e amplificação da resposta inflamatória. A resposta imune completa leva de 48 a 72 horas (106).

A hipersensibilidade tardia é a mesma reação que envolve a rejeição de órgãos pós-transplante, a doença celíaca, a dermatite de contato, as reações tuberculínica e granulomatosa (95,105,106). O teste de transformação de linfócitos mede a diferença na proliferação dos linfócitos do paciente na presença e ausência de antígenos da OI (28,95).

A síndrome de Cogan, que é uma doença caracterizada por DNS, episclerite e vasculite, tem causa desconhecida, tendo sido sugerida uma origem auto-imune (107). Acredita-se que a doença pode ser mediada por respostas tipo III e IV (95). Lunardi e cols., em estudo experimental, identificaram auto-anticorpos contra um peptídeo similar a auto-antígenos, que induziu dano tissular e características clínicas da síndrome de Cogan em cobaias, provando que essa é uma doença auto-imune (107).

1.6.3. Conceitos sobre a imunopatologia da DM

A OI, durante muito tempo, foi considerada isenta de imunidade celular ou humoral. Acreditava-se que, na ausência de trauma ou invasão patológica, o estado de anergia prevalecia (22,108). A possibilidade de que a DOI fosse decorrente de um mecanismo patológico imunomediado foi apresentada à comunidade científica, em estudo pioneiro, por McCabe, em 1979 (28).

A DOI imunomediada é caracterizada por DNS maior ou igual a 30 dB em qualquer frequência, de caráter progressivo, que evolui durante semanas ou meses, bilateral, assimétrica e assíncrona (semanas ou meses separam o envolvimento dos dois ouvidos), eventualmente associada à plenitude auricular, zumbido e vertigem. Os pacientes com doença ativa apresentam evidência de piora da DNS em pelo menos um ouvido, demonstrada pela progressão de 10 dB ou mais em uma ou mais frequências num período de três meses (35). O principal critério para distinguir a DM e a DOI imunomediada é o tempo de evolução dos sintomas. A DM caracteriza-se por curso lento, de meses a anos, enquanto a DOI imunomediada ocorre em um período de dias a meses (13).

Várias denominações sinonímicas foram dadas a essa entidade, possivelmente imunomediada, caracterizada por DNS bilateral, rapidamente progressiva e, até então, considerada idiopática. Em 2001, Rahman intitulou a doença de forma mais abrangente como doença vestibulococlear auto-imune (24). Existe considerável sobreposição entre as manifestações clínicas, com difícil diferenciação em bases clínicas e ausência de testes laboratoriais patognomônicos (70).

Trabalhos independentes de Yoo e Shea, no início da década de 1980, descreveram que o mecanismo auto-imune que causa a DOI imunomediada poderia atuar na etiopatogênese da DM (101,109). Yoo e cols. encontraram níveis elevados de anticorpos IgG-específicos, anti-colágeno tipo II, pela técnica de ELISA, em pacientes com DM e

otosclerose quando comparados com controles sem DOI (101). Shea relatou um caso de DM típica agravada por mecanismo imunomediado (109).

Várias características, em estudos clínicos e experimentais, sugerem a associação da DM com um mecanismo imunomediado, motivando muitos estudos experimentais e clínicos, que acumularam evidências da função imunológica da OI (4,54,57,63,87,89,90,109). O SE gera uma resposta imune que é capaz de causar dano à OI. A hidropisia pode ser desenvolvida, em animais de experimentação, pela injeção de antígenos. A presença de anticorpos contra antígenos da OI, a associação de determinados HLA no locus DR com a doença, as alterações no osso temporal relacionadas com mudanças imunológicas e a resposta a corticosteróides são características que, em conjunto com os elevados níveis de complexos imunes circulantes e imunoglobulinas no soro dos pacientes, sugerem que a DM é uma enfermidade imunomediada (20,54,69).

As evidências sorológicas, que favorecem a hipótese de McCabe, foram fornecidas por Harris e Sharp. Os autores encontraram anticorpos circulantes contra antígenos cocleares em pacientes com DNS progressiva, bem como em cobaias imunizadas com extrato de proteína coclear (16). A presença de auto-anticorpos na DOI teria relação com resposta ao corticosteróide, apresentando melhora dos sintomas (35).

A HSP, proteína de choque de calor, é a denominação de um grupo de proteínas constitutivas, produzidas por patógenos e hospedeiro, que aumentam rapidamente sua concentração em resposta à exposição das células a estresses ambientais, ocorrendo em bactérias e seres humanos (36,65). Existem muitas controvérsias sobre a função dessas proteínas. As evidências sugerem que a HSP auxilia na recuperação da conformação das proteínas (36).

As HSPs são nomeadas pela sua massa molecular, determinada por sua migração em géis SDS-PAGE. Assim, temos HSP100, HSP 90, HSP70, HSP 60, HSP30 e HSP15. Elas pertencem a famílias multigênicas com genes homólogos que codificam proteínas com diferentes funções celulares (110).

A família HSP70 é o grupo mais abundante e evolutivamente conservado. Por atuarem como guias moleculares, as HSP estão associadas a proteínas desnaturadas e envolvidas no primeiro passo do processamento de antígenos. A proteína do grupo HSP70 tem um tamanho que varia de 66 a 78 Kd. A HSP70 endógena apresenta atividade terapêutica protetora em processos tumorais e infecciosos, dirigindo os peptídeos para o MHC de classe I, promovendo uma resposta CD8 específica para esse peptídeo (83,110,111). Os anticorpos anti-HSP70 são produzidos em pacientes com artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, colite ulcerativa, infecções a diversos patógenos e em indivíduos aparentemente saudáveis (36).

Várias publicações associam os auto-anticorpos a DM e DOI imunomediada (16,35,36,67,69). Em todas essas patologias, assim como em pacientes saudáveis, não sabemos se a resposta imune é redirecionada contra as seqüências do HSP do patógeno ou se o aumento das seqüências do HSP do hospedeiro ocorre em resposta ao estresse, nem tampouco se as duas afirmações são verdadeiras. A produção local de HSP pode refletir a presença de genes HSP70-específicos para a OI ou produção de HSP70 órgão-específica. Independentemente da origem, a indução ou amplificação da resposta imune celular ou humoral para a HSP, potencialmente, pode causar dano aos tecidos que abrigam a seqüência de HSP. As possibilidades apresentadas podem fornecer novos significados sorológicos para classificar a DM e fornecer indícios sobre a patogênese e a terapêutica da doença (36).

Estudos revelam que os pacientes com DNS rapidamente progressiva têm sintomatologia comum com os pacientes com a DM, sugerindo que essas duas doenças, associadas à presença de auto-anticorpos anti-HSP70, podem ter uma patogênese comum, ou que representam manifestações clínicas diferentes dentro de um mesmo espectro de doença (112).

A DOI imunomediada, quando os sintomas vestibulares estão presentes, em alguns casos preenche os critérios para DM, principalmente se associada à presença dos auto-anticorpos anti-HSP70. Nesses casos, as duas patologias podem ser indistinguíveis (69). O fato de que nem sempre é possível diferenciar essas entidades com base somente em suas características clínicas, pela falta de testes diagnósticos definitivos, corrobora tal suspeita (36,69,112).

Um artigo de Rauch e cols. avaliou pacientes com critérios para DM divididos em quatro subgrupos: DM bilateral, DNS unilateral seguida por DM na orelha contralateral, DM unilateral seguida por DNS rapidamente progressiva na orelha contralateral e DM ocorrendo na orelha em que, previamente, ocorreu surdez súbita. O teste de anti-HSP70 por WB foi positivo em 47% dos pacientes com doença unilateral e em 50% dos com doença bilateral, sugerindo que um processo imunomediado possa estar envolvido na patogênese da doença (36).

Hirose e cols. avaliaram pacientes com DNS progressiva dos quais 40% tiveram diagnóstico de DM (69). Fuse e cols. argumentaram que alguns pacientes com DOI imunomediada, sem vertigem, apresentavam DNS isolada, que seria um estágio relativamente precoce da doença. Contudo, os pacientes com DM típica sofrem de DNS com flutuação auditiva, que seria característica de um estágio mais avançado da doença, inconstante, e que poderia ser modificada pelo sistema imune do doente (113).

Entretanto, os dados histopatológicos não confirmam a hipótese de que a DM idiopática resulta da tradicional destruição imunomediada da OI. As alterações em ossos temporais de estudos experimentais de DOI imunomediada mostraram que a resposta direta contra a OI resulta em degeneração do órgão de Corti, proliferação difusa do tecido fibroso, osteogênese e hidropisia endolinfática. As alterações presentes na DM são mais tênues, e a hidropisia é o achado patológico primário. Portanto, a DM não seria decorrente de um processo inflamatório fulminante, mas sim de uma resposta imune da OI, que poderia resultar na secreção de citocinas ou mediadores imunes, incluindo anticorpos direcionados contra estruturas da OI. Os auto-anticorpos presentes alterariam a homeostase, sendo tóxicos para o processo metabólico da OI, mesmo sem envolver resposta inflamatória (12).

Um estudo de Fuse e cols. avaliou os níveis de citocinas intracelulares, através da citometria de fluxo, no soro de pacientes com DNS flutuante, aguda, em freqüências graves, em comparação a pacientes com DM e a controles saudáveis. Nenhum dos pacientes avaliados no estudo apresentava doença auto-imune, alérgica ou sistêmica, exceto a DOI. Quando comparados ao grupo controle, os pacientes com DNS flutuante, aguda, em freqüências graves, apresentaram aumento dos níveis de interferon gama produzido por linfócitos T do tipo T_H1 , enquanto os pacientes com DM mostraram aumento da atividade das células NK. Os resultados sugerem a possibilidade de que a etiologia de ambas as doenças envolva resposta imune. A anormalidade do balanço T_H1/T_H2 apresentada em pacientes com DNS aguda, em freqüências graves, e o aumento da atividade das células NK na DM são característicos de DOI imunomediada (113).

Alguns trabalhos experimentais que evidenciaram a presença, no labirinto, de células plasmáticas e linfócitos, produtores de mediadores inflamatórios, sugerem que a DM é uma doença imune mediada por células. A dose de antígenos é um fator importante

para a definição do eixo T_{H1}/T_{H2} . Quando os antígenos estão presentes em baixa concentração, a resposta T_{H1} predomina. Fuse e cols. encontraram pacientes com DM e DNS aguda em frequências graves, apresentando níveis altos de CD4/CD8 e baixos de T_{H1} , favorecendo essa concepção. As células NK estão presentes em órgãos envolvidos na regulação da resposta imune a auto-antígenos (113).

1.7. Métodos diagnósticos imunológicos

Devido à semelhança fenotípica entre algumas formas de DNS progressivas, súbitas e flutuantes, como a hidropisia endolinfática e a surdez genética, a padronização de testes específicos que auxiliem no diagnóstico diferencial e, conseqüentemente, contribuam para a instituição do tratamento precoce, representarão um avanço importante no intuito de parar ou reverter o dano ocasionado à OI pela doença (38).

Os testes laboratoriais de imunidade celular e humoral, com antígenos específicos derivados da OI, foram desenvolvidos na tentativa de confirmar o diagnóstico e determinar quais pacientes se beneficiariam com o tratamento imunossupressivo. Alguns trabalhos mostraram a relação entre o resultado positivo em tais testes e o tratamento com corticosteróides, ocasionando, inicialmente, melhora nos limiares auditivos dos pacientes (55). Apesar de todas as evidências já mencionadas de atividade imune na OI, os testes de imunidade celular e humoral foram inconsistentes ou normais, inclusive em pacientes com enfermidades de etiologia auto-imune, como a síndrome de Cogan (27). As evidências de que a DM seja causada por mecanismo imunomediado são fortes (20), mas os testes disponíveis atualmente são geralmente normais. Por isso, é possível suspeitar que exista outra origem imunomediada para o desenvolvimento dos sintomas (27). Algumas questões precisam ser melhor esclarecidas sobre a relevância de tais testes como marcadores da

doença e, por isso, as pesquisas nessa área têm despertado muito interesse nas últimas três décadas.

McCabe, quando descreveu a DOI imunomediada, admitiu que a falta de um teste diagnóstico padrão áureo induz o médico a usar tratamentos imunossupressores baseados na clínica. No caso dessa doença, tal prática pode expor o paciente a riscos (28). Vários testes de triagem foram propostos, alguns avaliando a imunidade celular e outros avaliando a imunidade humoral. O teste de imunidade celular, inibição da migração de linfócitos (MIF), foi sugerido com restrições por McCabe, uma vez que apresentava resultados duvidosos em termos de especificidade. Posteriormente, relatos de que somente um terço dos pacientes com todos os critérios clínicos para DOI imunomediada apresentavam o resultado do teste positivo, confirmaram as suspeitas de McCabe, e o teste não foi incluído na rotina da investigação diagnóstica (114).

Os testes antígeno-específicos incluem o teste de transformação de linfócitos (LTT), a imunofluorescência e o HSP70. O LTT foi proposto por Hughes na década de 1980, utilizando a membrana de OI não refinada como antígeno não putativo. O teste foi realizado com o isolamento dos linfócitos do paciente. Se estivessem sensibilizados, os linfócitos, ao serem expostos a antígenos da OI, seriam ativados e liberariam citocinas. Entretanto, o método não foi aceito pelas falhas metodológicas que o estudo apresentou. As dificuldades na realização do teste – inclusive a necessidade de um laboratório de imunologia com recursos tecnológicos, amostras de 30 ml de sangue que não podem ser congeladas e exigência de que o teste seja feito no máximo 18 horas após a coleta – fazem do LTT um teste inviável para a triagem diagnóstica (115).

A imunofluorescência indireta é um teste da imunidade humoral que é utilizado para a pesquisa de anticorpos direcionados contra vários elementos celulares e teciduais. Na DOI, essa técnica foi utilizada para identificar auto-anticorpos contra tecidos da OI. O

teste é rápido e de fácil realização quando comparado aos testes de imunidade celular, necessitando de menor quantidade de sangue e permitindo que as amostras sejam congeladas por longos períodos. Porém, não existem estudos quanto ao seu valor prognóstico e terapêutico na DOI (114). Conforme Brookes, os pacientes com DM apresentam incidência aumentada de auto-anticorpos (76). Plester, em 1988, observou grandes quantidades de auto-anticorpos não específicos para a OI no soro de pacientes com DOI quando comparados a um grupo controle. Tais anticorpos são semelhantes aos típicos anticorpos encontrados em doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crônicas de provável causa imunomediada (114).

O colágeno tipo II está presente na cápsula ótica da OI (67). Estudos em cobaias imunizadas com colágeno tipo II mostraram, pelo método ELISA, anticorpos IgG-específicos no SE de cobaias, com relato de disfunção vestibular e perda de audição (101,102). Embora os estudos de Muino sugiram que a presença de anticorpos IgG-específicos anti-colágeno tipo II esteja associada à etiopatogenia das doenças DM e DNS progressiva e represente um índice de gravidade e cronicidade, não há um consenso para o emprego clínico desse conhecimento (102).

Brookes também relatou que os pacientes com DM apresentavam maior quantidade de complexos imunes circulantes, que poderiam ser o fator etiológico da doença, decorrente do processo patológico local na OI. Entretanto, a presença de complexos imunes poderia ser um epifenômeno da doença, já que nenhuma relação foi encontrada entre complexos imunes e a atividade da doença (76). Atlas demonstrou a presença de anticorpos contra proteínas de OI bovina 68 kD e 42-a 45-kD no soro de pacientes com DM. Todos os 12 pacientes com DM bilateral e 16 dos 24 pacientes com DM unilateral apresentaram auto-anticorpos anti-HSP70, comparados com somente quatro entre os 44 pacientes normais do grupo controle (54).

A auto-imunidade na OI tem também sido investigada através da anti-laminina, já que a laminina é um antígeno tecidual endógeno que poderia ser estimulado por um processo infeccioso persistente (20,67). Estudos histoquímicos mostraram que a reatividade à laminina resulta do epítipo Gal alfa 1-3 presente em oligossacarídeos da laminina de rato. Embora a laminina seja extensivamente distribuída na OI, não foi observada reação à laminina humana na ausência do epítipo Gal alfa 1-3 (20).

O teste do anti-HSP70 foi introduzido no diagnóstico de perda auditiva progressiva. Muitos trabalhos relacionaram a positividade no teste também com a DM. O método foi introduzido por Harris e Sharp, que publicaram sua experiência com o teste do anti-HSP70 pelo método de WB. O teste faz parte da rotina diagnóstica em muitos centros de referência em otologia (16,35,87,114,116). Segundo Moscicki, o paciente com resultado positivo no teste WB e quadro clínico de DNS bilateral, progressiva e idiopática, de início recente (dias a semanas), apresenta doença ativa, devendo ser tratado com corticóide, pois há chance de resposta favorável (35). A baixa sensibilidade do teste de WB permite que, em caso de suspeita clínica, o teste terapêutico com corticosteróides seja realizado (38). Embora muitos estudos façam referência ao anti-HSP70 por WB como um teste promissor para o diagnóstico de DM e DOI imunomediada, estudos recentes não confirmam a ligação entre o HSP no soro e a DM (20).

O soro dos pacientes com DM tem sido testado para a presença de auto-anticorpos anti-HSP70 pelo método WB, usando extrato renal bovino como antígeno (16,35-38,65,67-69,112). Gottschlich e cols. encontraram auto-anticorpos anti-HSP70 em 30% de 50 pacientes, e Shin e cols. encontraram anti-HSP70 em 33% de 60 pacientes com DM (112). Rauch e cols. avaliaram 30 casos de DM severa testados pelo anti-HSP70 e encontraram um resultado positivo em 47% dos pacientes. Os auto-anticorpos foram encontrados em

33% dos casos unilaterais, 37,5% de hidropisia tardia contralateral e em 59% dos casos de doença bilateral (36).

Os testes sorológicos antígeno-inespecíficos, como o complemento sérico, a velocidade de sedimentação de eritrócitos (VSG), complexos imunes circulantes (IgA, IgG, IgM), a proteína C reativa e os auto-anticorpos (fator reumatóide, fator antinuclear, anti-tireoglobulina), são a evidência indireta de atividade imunológica (114). A proteína C reativa ou o VSG seriam igualmente sensíveis para avaliar pacientes com DOI imunomediada ou infecção crônica e para sugerir a necessidade de outros testes com a investigação de uma possível doença sistêmica. A fração C1q do complemento, que apresenta afinidade por imunocomplexos, deveria estar reduzida no soro dos pacientes com DOI imunomediada após a lesão tissular. Contudo, o estudo de Hirose não revelou relevância clínica nos pacientes com a dosagem de C1q alterada, nem evidência de doenças por imunocomplexos em pacientes com DM (69).

Há um consenso de que os testes de imunidade celular, embora produzam resultados interessantes, são tecnicamente complicados para serem realizados em laboratório clínico. A escassez de ossos temporais humanos disponíveis com DM e as dificuldades em estudá-los dificultam a pesquisa até mesmo por parte de pesquisadores altamente qualificados. Assim, os anticorpos séricos para proteína recombinante derivada de OI, pela maneira simples como são detectados, constituiriam o método ideal para rastreamento e diagnóstico. O mais promissor teste, até o momento, parece ser o anti-HSP70, já que vários artigos demonstraram a correlação entre a positividade nesse teste e a resposta a corticosteróide (12,55). Vários resultados conflitantes têm sido relatados e, conseqüentemente, o antígeno alvo na OI ainda não está claro (20).

Atualmente, alguns estudos sugerem que o diagnóstico de DOI imunomediada deveria incluir, além dos critérios clínicos, a pesquisa do auto-anticorpo anti-HSP70, por

WB, e do VSG. Quando o VSG estiver elevado, testes mais específicos para doenças sistêmicas devem ser solicitados, conforme a suspeita clínica (69). O teste do anti-HSP70 mostrou-se o mais específico e com melhor valor preditivo positivo entre os apresentados para o diagnóstico da DOI imunomediada, segundo a literatura (16). Entretanto, pela baixa sensibilidade do teste, pacientes com o teste negativo podem ter melhora com o uso de corticosteróide. A relevância do teste na DM ainda é cercada de controvérsias.

Segundo Munari e cols., o principal problema do WB realizado no rastreamento de DOI e DM imunomediada é que geralmente usa lisado celular inteiro, potencialmente levando a resultados falso-positivos que reconhecem outras proteínas de 70 kD que, na verdade, não são o HSP70. No estudo que publicamos em 2003, verificamos que a quantidade de HSP70 presente é crítica no WB, e que altas quantidades de HSP70, mesmo em normais, podem resultar em um teste positivo. Na verdade, o anti-HSP70 está presente em baixos níveis em todas as pessoas. Outro problema é a desnaturação da proteína, que afeta o reconhecimento pelo soro do paciente. Os resultados sugerem que o WB não é um método adequado para identificar auto-anticorpos para a HSP70 (33) .

Um terceiro e mais sério problema é a falta de pureza do antígeno, associado ao fato de o soro do paciente e do controle apresentar anticorpos reativos a antígenos adicionais presentes no extrato bruto, como a albumina bovina, que tem um peso molecular ligeiramente menor do que 68 kDa, freqüentemente distorcendo essa região do *blot* (16,49). A solução para o problema da impureza dos antígenos seria a realização dos testes com proteína recombinante (117).

Na ausência de um teste específico e confiável para o diagnóstico de DOI e DM imunomediadas, o padrão áureo continua sendo a melhora clínica sustentada, por pelo menos 4 semanas, após um curso de terapia imunossupressora, embora este seja um método impreciso (69). Alguns autores sugerem que todos os doentes com DNS idiopática

deveriam realizar avaliação laboratorial auto-imune. Outros autores propõem a seleção dos pacientes que não responderam à terapêutica convencional e que apresentem simultaneamente doenças imunológicas ou testes de triagem anormais para realizar os testes para auto-anticorpos dos antígenos da OI (70).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar a frequência de auto-anticorpos anti-HSP70 pelos métodos de ELISA e WB em pacientes com DM (grupo de estudo) comparado ao grupo controle constituído por pacientes com DOI que não preencham os critérios para a DM .

3. REFERÊNCIAS

1. Atkinson M. Ménière's original papers. Reprinted with an English translation together with commentaries and biographical sketch. Acta Otolaryngol [Suppl] (Stockh).1961; 162.
2. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;113(3):181-5.
3. Hughes GB. Ménière's disease. Hearing Health. 2001;17:2.
4. Cruz OL, Costa SS. Disacusia neurossensorial imunomediada. In: Cruz OL, Costa SS. Otologia clínica e cirúrgica. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p. 307-14.
5. Cruz OL, Costa SS. Malformações da orelha interna – disacusias genéticas In: Cruz OL, Costa SS. Otologia clínica e cirúrgica. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p. 111.
6. Rauch SD, Merchant SN, Thedinger B. A. Ménière's syndrome and endolymphatic hydrops, double-bind temporal bone study. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1989;98:873-83.
7. Hallpike CS, Cairns H. Observation on pathology of Ménière Syndrome. J Laryngol Otol. 1938;53:625-55.
8. Guild S. The circulation of the endolymph. Am J Anat. 1927;39:57-81.
9. da Costa SS, de Sousa LC, Piza MR. Meniere's disease: overview, epidemiology, and natural history. Otolaryngol Clin North Am. 2002;35(3):455-95.
10. Cahali S, Cahali MB, Lavinsky L, Cahali RB. Hidropsia endolinfática. Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 479-85.
11. Merchant SN, Rauch SD, Nadol JB Jr. Ménière's disease. Eur Arch Othorhinolaryngol. 1995;252(2):63-75.

12. Ruckenstein MJ. Immunologic aspects of Ménière's disease. *Am J Otolaryngol.* 1999;20(3):161-5.
13. Stone JH, Francis HW. Immune-mediated inner ear disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(1):32-40.
14. Paparella MM, Djalilian HR. Etiology, pathophysiology of symptoms and pathogenesis of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 2002;35(3):529-45.
15. Oliveira do Valle L, Almeida CI, Alves FR, Breuel ML. Perda Auditiva Progressiva. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 346-66.
16. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope.* 1990;100(5):516-24.
17. Nina LG, Lourenço EA. Doenças imunomediadas da orelha interna. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 140-47.
18. Proctor CA, Proctor TB, Proctor B. Etiology and treatment of fluid retention (hydrops) in Ménière syndrome. *Ear Nose Throat J.* 1992;71(12):631-5.
19. Cao MY, Deggouj N, Gersdorff M, Tomasi JP. Guinea pig inner ear antigens: extraction and application to the study of human autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope.* 1996;106(2 Pt 1):207-12.
20. Yoo TJ, Du X, Kwon SS. Molecular mechanisms of autoimmune hearing loss. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2002;548:3-9.
21. Bernstein JM, Shanahan TC, Schaffer FM. Further observation on the role of the MHC genes and certain hearing disorders. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(5):666-71.
22. Garcia Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Immune response and immunopathology of inner ear: um update. *J Laryngol Otol.* 2000;114(2):101-7.

23. Yimtae K, Song H, Billings P, Harris JP, Keithley EM. Connection between the inner ear and the lymphatic system. *Laryngoscope*. 2001;111(9):1631-35.
24. Rahman M, Poe D, Choi H. Autoimmune vestibulo-cochlear disorders. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13(3):184-9.
25. Hughes GB, Barna BP, Kinney SE, Calabrese LH, Nalepa NJ. Clinical diagnosis of immune inner ear disease. *Laryngoscope*. 1998;98(3):251-3.
26. Ruckenstein MJ. Autoimmune ear disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;12(5):426-30.
27. Derebery MJ. The role of allergy in Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am*. 1997;30(6):1007-15.
28. McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979;88(5 Pt 1):585-9.
29. Welling DB. Clinical evaluation and treatment of immune-mediated inner ear disease. *Ear Nose Throat J*. 1996;75(5):301-5.
30. Rauch SD. Clinical, management of immune-mediated inner-ear disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;830:203-10.
31. Vinceneux P, Couloigner V, Pouchot J, Bouccara D, Sterkers O. Autoimmune deafness. *Presse Med*. 1999;28(34):1904-10.
32. Berrettini S, Ravecca F, Bruschini L, Ursino F, Sellari-Franceschini S. Progressive sensorineural hearing loss: immunologic etiology. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 1998;18(4 Suppl 59):33-41.
33. Munari L, Charcat S, Rodrigues L, von Muhllen CA, Bau AR, Lavinsky L, Bonorino C. An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *J Immunol Methods*. 2003;283(1-2):155-61.

34. Bloch DB, Gutierrez JA, Guerriero V, Rauch SD. Recognition of a dominant epitope in bovine heat-shock protein 70 in inner ear disease. *Laryngoscope*. 1999;109(4):621-5.
35. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB Jr, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticoid treatment. *JAMA*. 1994;272(8):611-6.
36. 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):648-52.
37. Billings PB, Keithley E, 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(3):181-8.
38. Garcia Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope*. 2002;112(2):304-9.
39. Alford BR. Committee on Hearing and Equilibrium. Ménière's disease: criteria for diagnosis and evaluation of therapy for reporting. *Trans Am Acad Ophthalmol Otol*. 1972;5:1462-4.
40. Pearson BW, Brackmann DE. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for reporting treatment results in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1985;93(5):579-81.
41. Nakae K, Komatuzaki K. Epidemiological study of Meniere's disease. *Pract Otol (Kyoto)*. 1984; 69:1783-8.
42. Tokumasu K, Tashiro N, Goto K. Incidence and prevalence of Meniere's disease in Asgamiyara city, Kanagawa-Ken. *Pract Otol (Kyoto)*. 1983; (Suppl 3):1165-75.

43. Haid CT, Watermeier D, Wolf SR, Berg M. Clinical survey of Ménière's disease: 574 cases. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1995;520 Pt 2:251-5.
44. Wladislavosky-Waserman P, Facer GW, Mokri B, Kurland LT. Meniere's disease: a 30-year epidemiologic and clinical study in Rochester, Mn, 1951-1980. *Laryngoscope.* 1984;94(8):1098-102.
45. Watanabe I. Incidence of Meniere's disease, including some other epidemiological data. In: Oosterveld WJ, editor. *Meniere's disease: a comprehensive appraisal.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1983. p. 9-23.
46. Kotimäki J, Sorri M, Aantaa E, Nuutinen J. Prevalence of Ménière's disease in Finland. *Laryngoscope.* 1999;109(5):748-53.
47. Morrison AW, Johnson KJ. Genetic (molecular biology) in Ménière's disease. *Am J Otol.* 2002;35:497-516.
48. Paparella MM. The cause (multifactorial inheritance) and pathogenesis (endolymphatic malabsorption) of Meniere's disease and its symptoms (mechanical and chemical). *Acta Otolaryngol.* 1985;99(3-4):445-51.
49. Schwaber MK. Transtympanic gentamicin perfusion for the of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 2002;35(2):287-95.
50. Slattery WH 3rd, Fayad JN. Medical treatment of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 1997;30(6):1027-37.
51. Thorp MA, Shehab ZP, Bance ML, Rutka JA; AAO-HNS Committee on Hearing and Equilibrium. The AAO-HNS Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease: have they been applied in the published literature of the last decade? *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2003;28(3):173-6.

52. Morrison AW, Mowbray JF, Williamson R, Sheeka S, Sodha N, Koskinen N. On genetic and environmental factors in Meniere's disease. *Am J Otol.* 1994;15(1):35-9.
53. Arweiler DJ, Jaahnke K, Grosse-Wilde H. Ménière's disease as an autosomal dominant hereditary disease. *Laryngorhinootologie.* 1995;74(8):512-5.
54. Atlas MD, Chai F, Boscatto L. Meniere's disease: evidence of an immune process. *Am J Otol.* 1998;19(5):628-31.
55. Barna B, Hughes GB. Autoimmune inner ear disease - a real entity?. *Clin Lab Med.* 1997;17(3):581-94.
56. Boulassel MR, Tomasi JP, Deggouj N, Gersdorff M. COCH5B2 is a target antigen of inner ear antibodies in autoimmune inner ear disease. *Otol Neurotol.* 2001;22(5):614-8.
57. Kazmieczak H, Dororszewska G. Metabolic disorders in vertigo, tinnitus, and hearing loss. *Int Tinnitus J.* 2001;7(1):54-8.
58. Kraft JR. Hyperinsulinemia: a merging history with idiopathic tinnitus, vertigo, and hearing loss. *Int Tinnitus J.* 1998;4(2):127-30.
59. Lavinky L, D'Ávila C. Tratamento etiológico da Síndrome de Ménière. In: Lavinky L. *Tratamento em Otologia*, 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 426-33.
60. Lavinsky L, Lavinsky J, D'Ávila C. Tratamento das principais disacusias neurossensoriais de causa sistêmica. In: Lavinky L. *Tratamento em Otologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 415-25.
61. Lavinky L, D'Ávila C. Tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos com repercussão otológica. In: Lavinky L. *Tratamento em Otologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 373-77.

62. Rubin W. Tratamento das doenças sistêmicas com repercussão otoneurológica. In: Lavinky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 557-63.
63. Scasso CA, Bruschini L, Berrettini S, Bruschini P. Progressive sensorineural hearing loss from infectious agents. *Acta Otorhinolaryngol.* 1998;18(4 Suppl 59):51-4.
64. Arenberg IK, Lemke C, Shambaugh GE Jr. Viral theory for Ménière's disease endolymphatic hydrops: overview and new therapeutic options for viral labyrinthitis. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;830:306-13.
65. Derebery MJ. Prevalence of heat shock protein in patients with Ménière's disease and allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;126(6):677-82.
66. Howard BK, Mabry RL, Meyerhoff WL. Use of a screening RAST in a large neuro-otologic practice. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117(6):653-9.
67. Yamanobe S, Harris JP. Inner ear-specific autoantibodies. *Laryngoscope.* 1993;103(3):319-25.
68. Bloch DB, San Martin JE, Rauch SD, Moscicki RA, Bloch KJ. Serum antibodies to heat shock protein 70 in sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121(10):1167-71.
69. Hirose K, Wener MH, Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope.* 1999;109(11):1749-54.
70. von Muhlen C, Picarelli MM. Rotinas no tratamento de afecções auto-imunes com repercussão otológica. In: Lavinky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 17-21.
71. Mouadeb DA, Ruckenstein M. Antiphospholipid inner ear syndrome. *Laryngoscope.* 2005;115(5):879-83.

72. Takeda T, Takeda S, Kitano H. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res.* 2000;140(1-2):1-6.
73. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin, and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.
74. Lavinsky L, Oliveira MW, Bassanesi HJ, D'Ávila C, Lavinsky M. Hyperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J.* 2004;10(1):24-30.
75. Keles E, Godekmerdan A, Kalidag T, Kaygusuz I, Yalcin S, Cengiz AH, Aral M. Ménière's disease and allergy: allergens and cytokines. *J Laryngol Otol.* 2004; 118(9): 668-93.
76. Brookes GB. Circulating immune complexes in Ménière's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;12(5):536-40.
77. Segal S, Eviatar E, Berenholz L, Kessler A, Shamkovitch N. Is there a relation between acoustic trauma or noise-induced hearing loss and a subsequent appearance of Ménière's Disease? An epidemiologic study of 17245 cases and review of the literature. *Otol Neurotol.* 2003;24(3):387-91.
78. Woldag K, Schwarzer A. Chronic myeloid leukemia: a rare cause of labyrinth apoplexy. *Laryngorhinootologie.* 1996;75(4):247-9.
79. Gibson WP, Arenberg IK. Pathophysiologic theories in the etiology of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin North Am.* 1997;30(6):961-7.
80. Ovortrup K, Rostgaard J, Holstein-Rathlou NH, Bretlau P. The endolymphatic sac, a potential endocrine gland? *Acta Otolaryngol.* 1999;119(2):194-9.
81. Gussen R. Vascular mechanism in Ménière's disease. Theoretical considerations. *Arch Otolaryngol.* 1982;108(9):544-49.

82. Sperling NM, Paparella MM, Yoon TH, Zelterman D. Symptomatic versus asymptomatic endolymphatic hydrops: a histopathologic comparison. *Laryngoscope*. 1993;103(3):277-85.
83. Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr KW, Young RA, Kaufmann SH. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J Immunol*. 1989;143(9):2844-9.
84. Katsarkas A. Hearing loss and vestibular dysfunction in M. *Acta Otolaryngol*. 1996;116(2):185-8.
85. Filipo R, Barbara M. Natural history of Ménière's disease staging the patients and of their symptoms. *Acta Otolaryngol*. 1997;526:10-3.
86. Perez R, Chen JM, Nedzelski JM. The status of the contralateral ear in established unilateral Meniere's disease. *Laryngoscope*. 2004;114(8):1373-6.
87. Arnold W, Altermatt HJ, Gebbes JO. Demonstration of immunoglobulins (IgA, IgG) in the human endolymphatic sac. *Laryngol Rhinol Otol*. 1984;63:464-7.
88. Silverstein H, Smouha E, Raleigh J. Natural history vs. surgery for Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;100(1):6-16.
89. Harris JP. Immunology of inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1984;93:147-62.
90. Harris JP, Woolf N, Ryan AF. The elaboration of systemic immunity following inner ear immunization. *Am J Otolaryngol*. 1985;6:148-52.
91. Harris JP, Ryan AF. Fundamental immune mechanisms of the brain and inner ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;112(6):639-53.
92. Harris JP, Ryan AF. Effect of a middle ear immune responses on inner ear antibody levels. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985;94(2):202-6.

93. Couloigner V, Sterkers MT, Rask-Andersen H, Ferrary E. Le sac endolymphatique: ses fonctions au sein de l'oreille interne. *Medecine/Sciences*. 2004;20:304-10.
94. Dornhoffer JL, Waner M, Arenberg IK. Immunoperoxidase study of the endolymphatic sac in Ménière's disease. *Laryngoscope*. 1993;103(9):1027-34.
95. Dornhofler JL, Kaufman A. Immune mechanisms in Ménière's syndrome. *Otolaryngol Clin North Am*. 1997;30(6):1017-26.
96. Takahashi M, Harris JP. Analysis of immunocompetent cells following inner ear immunostimulation. *Laryngoscope*. 1988;98(10):1133-8.
97. Garcia Berrocal JR, Vargas JA, Ramírez-Camacho R, González FM, Gea-Banacloche JC, Vergara J, Durántez A. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123(7):712-7.
98. Filipo R, Mancini F, Nostro G. Ménière's disease and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;830:299-305.
99. Harris JP. Experimental autoimmune sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*. 1987;97(1):63-76.
100. Derebery MJ, Rao VS, Siglock TJ, Linthicum FH, Nelson RA. Ménière's disease: an immune complex-mediated illness? *Laryngoscope*. 1991;101(3):225-9.
101. Yoo TJ, Stuart JM, Kang AH, Townes AS, Tomoda K, Dixit S. Type II collagen autoimmunity in otosclerosis and Ménière's Disease. *Science*. 1982;217(4565):1153-5.
102. Muino JC, Carreras R, Ocampo MA, Ferrero M, Piffiguer R, Landa C, Beltramo D. The importance of IgG autoantibodies, anti-collagen type II specific in Ménière disease and progressive hearing loss. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 1999;56(2):71-80.

103. Harris JP, Woolf N, Ryan AF. A reexamination of experimental type II collagen autoimmunity: middle and inner ear morphology and function. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1986;95(2 Pt 1):176-80.
104. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive SNHL. *Laryngoscope.* 1990;100:516-24.
105. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular.* 4^a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 435-9.
106. Negreiros B, Ungier C. *Imunologia Elementar e Básica. Alergologia Clínica.* 1^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995. p. 3-11.
107. Lunardi C, Bason C, Leandri M, Navone R, Lestani M, Millo E, Benatti U, Cilli M, Beri R, Corrocher R, Puccetti A. Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet.* 2002;360(9337):915-21.
108. Ochoa VM, Weider DJ. Development of autoimmune sensorineural hearing loss after endolymphatic sac decompression: two case reports. *Otol Neurotol.* 2003;24(2):279-82.
109. Shea JJ. Autoimmune sensorineural hearing loss as aggravation factor in Ménière's: a preliminary report. *Adv Otorhinolaryngol.* 1983;30:254-7.
110. Mattei D, Scherf A, Bensaude O, da Silva LP. A heat shock-like protein from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* induces autoantibodies. *Eur J Immunol.* 1989;19(10):1823-8.
111. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70 associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med.* 1993;178(4):1391-6.
112. Shin SO, Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Comparison of anti-heat shock protein 70 and anti-68 kDa inner ear protein in the sera of patients with Ménière's disease. *Laryngoscope.* 1997;107(2):222-7.

113. Fuse TH, Oota N, Fukase S, Asano S, Kato T, Aoyagi M. Immunological responses in acute low-tone sensorineural hearing loss and Ménière's disease. *Acta Otolaryngol.* 2003;123(1):26-31.
114. Soliman AM. Immune-mediated inner ear disease. *Am J Otol.* 1992;13(6):575-79.
115. Bittar R, Thomé D, Nascimento E, Sanches T. Doenças auto-imunes da orelha interna: revisão da literatura. *Arquivos da Fundação de Otorrinolaringologia.* 1998;2(3).
116. Jongkees L. Treatment of vertigo. In: *Clinical Otology.* Vol. 3. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1983. p. 231-33.
117. Mehlert A, Young DB. Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71kD antigen, a member of the 70kD heat-shock protein family. *Mol Microbiol.* 1989;3(2):125-30.

4. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os materiais e métodos, os resultados e as conclusões deste trabalho serão apresentados na forma de um artigo, cuja versão em inglês foi submetida para publicação na revista *Laryngoscope*. As versões em português e inglês aparecem a seguir.

4.1. Artigo em língua portuguesa

FREQÜÊNCIA DE AUTO-ANTICORPO ANTI-HSP70 PELOS MÉTODOS ELISA E WESTERN BLOT EM PACIENTES COM DOENÇA DE MÉNIÈRE: UM ESTUDO CONTROLADO

Anne-Rose L. Wiederkehr Baú*, **Luiz Lavinsky**¹**, **Cristina Bonorino*****, **Leonardo Munari******

* Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

** PhD. Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

***PhD. Laboratório de Imunorreumatologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**** Laboratório de Imunorreumatologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Título resumido: **Anti-HSP70 em pacientes com doença de Ménière**

O trabalho foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

¹Autor correspondente: Luiz Lavinsky, Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: +55-51-3330.2444, e-mail: lavinsky.ez@terra.com.br

RESUMO

Objetivos: Determinar a frequência de auto-anticorpos anti-HSP70 pelos métodos de ELISA e *Western blot* e comparar os resultados pelos diferentes métodos em pacientes com doença de Ménière (DM) e em pacientes com doenças da orelha interna (DOI) que não preenchem os critérios para a DM.

Delineamento: Prospectivo, com delineamento do tipo caso-controle, em pacientes com DM e DOI não-Ménière.

Métodos: Amostras de sangue foram coletadas de 31 pacientes com DM e 78 pacientes com DOI não-Ménière e testadas para presença de anti-HSP70 com ELISA ou *Western blot*. Foram obtidos dados sobre os sintomas cocleares e vestibulares.

Resultados: No grupo com DM, 93,6% dos pacientes tiveram um intervalo de tempo maior que um ano entre o início dos sintomas e a realização dos testes laboratoriais, predominando a doença unilateral (58,1%). O anti-HSP70 foi detectado por ELISA em quatro pacientes (12,9%) e por *Western blot* em oito (25,8%). Somente um paciente com o teste de ELISA positivo apresentava doença ativa. Quanto ao *Western blot* com resultado positivo, dois pacientes estavam com a doença ativa e seis, inativa. A análise estatística não estabeleceu qualquer associação entre os achados sorológicos e os fatores clínicos da DM. No grupo com DOI não-Ménière, a doença bilateral ocorreu em 64,1%. Não foi encontrada associação entre lateralidade, tempo de evolução e atividade da doença com auto-anticorpos anti-HSP70.

Conclusão: A detecção de auto-anticorpos anti-HSP70 por ELISA e *Western blot* não ocorreu em frequência significativamente diferente em DM que em DOI não Ménière.

Palavras-chave: Doença de Ménière; anti-HSP70; saco endolinfático; sistema imune; doença da orelha interna; perda auditiva neurosensorial.

INTRODUÇÃO

Em 1861, Prosper Ménière descreveu uma entidade clínica decorrente de alterações na homeostasia da orelha interna. A doença de Ménière, como foi chamada, é associada a perda auditiva do tipo disacusia neurosensorial (DNS), episódios de vertigem com duração de 20 minutos a horas e zumbido na ausência de sintomas neurológicos ou seqüelas^{1,2}. O padrão característico de remissões e exacerbações e a apresentação clínica variada tornam o manejo da DM difícil e muitas vezes frustrante³.

A histopatologia da hidropisia endolinfática foi descrita pela primeira vez por artigos de Hallpike e Cairns, na Inglaterra, e de Yamakawa, no Japão. O termo hidropisia endolinfática designa uma alteração da orelha interna decorrente da distensão progressiva do espaço endolinfático, especialmente do ducto coclear e sáculo, embora o utrículo e as ampolas dos canais semicirculares também possam estar envolvidas⁴⁻⁶. Quando a causa de hidropisia não pode ser identificada, a desordem recebe o nome de DM, enquanto os casos com etiologia conhecida são classificados como síndrome de Ménière (SM)^{7,8}.

Historicamente, a DM é uma das patologias otorrinolaringológicas mais estudadas. Mesmo assim, ainda são escassas as possibilidades de tratamento⁹. A etiologia da DM, assim como de outras doenças da orelha interna, inclusive surdez súbita e surdez progressiva¹⁰, ainda é desconhecida¹¹. É possível que uma reação imunológica oculta seja a causa dessas enfermidades^{7,12,13}.

A orelha interna foi considerada segregada do sistema imune, pois se acreditava que estivesse isolada dentro da cápsula ótica, sem drenagem linfática¹⁴. As pesquisas nos últimos 30 anos modificaram esse conceito. Um estudo recente de Yimtae e cols. encontrou evidências de que existe drenagem da OI, através da orelha média, para linfonodos cervicais superficiais, e que a OI tem conexões próprias com os linfonodos. Há

evidências de que o saco endolinfático (SE) tem vasos que poderiam servir como via de drenagem para linfonodos regionais¹⁵.

Alguns pesquisadores sugerem que a etiopatogenia imunomediada é a causa de parte dos casos de DM anteriormente classificados como de etiologia idiopática^{8,12,16-18}. A dificuldade em estabelecer o diagnóstico de certeza da doença imunomediada persiste por não ser possível a retirada de amostras de tecido coclear do paciente doente.

O curso clínico da DM com flutuações auditivas, períodos assintomáticos e oscilações na severidade da doença, resultando em lenta e progressiva deterioração do órgão afetado, é semelhante ao que se observa em muitas doenças auto-imunes. Estas são exacerbadas por estresses físicos e psicológicos, uma observação que também é feita na DM^{19,20}.

A HSP, proteína de choque de calor, é a denominação de um grupo de proteínas constitutivas, produzidas por patógenos e hospedeiro, que aumentam rapidamente sua concentração em resposta à exposição das células a estresses ambientais, ocorrendo em bactérias e seres humanos^{48, 49}. Existem muitas controvérsias sobre a função dessas proteínas. As evidências sugerem que a HSP auxilia na recuperação da conformação das proteínas⁴⁸.

O presente estudo buscou determinar 1) se há relação entre a presença do auto-anticorpo anti-HSP70 e certos fatores clínicos da DM, 2) se essa relação varia durante o curso da doença e 3) se a presença de anti-HSP70 serve para distinguir um subgrupo da DM. Para tanto, os achados sorológicos dos pacientes com DM foram comparados aos de um grupo de pacientes com DOI não-Ménière.

PACIENTES E MÉTODOS

Realizamos um estudo prospectivo, com delineamento do tipo caso-controle²¹, para avaliar a frequência de auto-anticorpos anti-HSP70 pelos métodos de ELISA e WB. O grupo de estudo foi formado por pacientes com DM, conforme os critérios definidos pela Academia Americana de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço^{2,22}, e foi comparado ao grupo controle de pacientes com DOI sem critérios para a DM.

A partir de um cadastro prévio de 64 pacientes do Ambulatório de DM do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, convidamos os pacientes, por correspondência simples, a participar do grupo de estudo. Na ocasião, os pacientes foram orientados quanto aos objetivos do trabalho e quanto à liberdade total em participar ou não do estudo, sem que isso implicasse em qualquer modificação na continuidade do tratamento no hospital. Quinze pacientes não compareceram para avaliação médica em resposta à correspondência. Entre os 49 que foram avaliados, 18 foram excluídos por não preencher os critérios padronizados para DM. Assim, 31 pacientes constituíram o grupo de estudo.

O grupo controle foi composto por 81 pacientes com outras DOI, que não a DM, atendidos no ambulatório de otologia. Três pacientes foram excluídos por serem diabéticos; portanto, 78 pacientes fizeram parte do grupo. O estudo foi conduzido com a avaliação de 109 pacientes.

A investigação clínica nos dois grupos incluiu anamnese, exame clínico otorrinolaringológico, exame otoneurológico, exames de busca etiológica, pesquisa de auto-anticorpos pelos métodos de ELISA e WB e exames de imagem, em caso de perda auditiva unilateral. O teste do glicerol foi realizado somente no grupo de estudo. Os dados clínicos foram analisados de acordo com os itens do protocolo de investigação de pacientes com DM (Anexo 1) desenvolvido para o estudo.

A coleta das amostras de 5 ml de sangue venoso dos pacientes dos grupos de estudo e controle foi feita após preenchimento do termo de consentimento informado (Anexo 2).

História clínica

Os pacientes incluídos no grupo de estudo foram diagnosticados de acordo com os seguintes critérios^{2,23}:

- 1) DNS flutuante ou progressiva demonstrada por audiometrias seriadas e/ou pelo teste do glicerol positivo. O parâmetro para avaliar os limiares auditivos foi a média de 4 frequências de tons puros (500 Hz, 1 kHz, 2 kHz, 3 kHz).
- 2) Crises de vertigem paroxística recorrente típica da DM, com duração de 20 minutos até 24 horas (no mínimo dois episódios).
- 3) Zumbido unilateral ou bilateral.

Foram excluídos do estudo os pacientes com história de tratamento com imunossupressores ou antiinflamatórios corticosteróides nos últimos três meses, queimadura, diabetes melito, doença de Alzheimer, colite ulcerativa, câncer, febre ou infecção recente por influenza, pois essas condições alteram os valores do HSP70²⁴. No grupo de estudo, foram excluídos pacientes com evidência de comprometimento do sistema nervoso central, como tumor afetando o VIII nervo craniano e evidência de outras entidades clínicas que possam mimetizar as manifestações clínicas da DM (*Ménière-like*). Além do sexo e da idade, os sintomas clínicos relacionados com a doença foram avaliados: características da vertigem e da perda auditiva, presença de plenitude aural, zumbido, história familiar, duração da doença, lateralidade e atividade da doença.

O intervalo de tempo desde a crise de vertigem ou flutuação auditiva mais recente foi avaliado. A doença foi considerada ativa na presença de crise de vertigem ou flutuação auditiva nos 30 dias que antecedem a coleta das amostras de sangue²⁵. A duração da

doença foi definida em função do momento do início dos sintomas nos pacientes que preenchem os critérios para DM^{2,23}.

Exames radiológicos

Exames de imagem, como a tomografia computadorizada com contraste, e, se necessário, a ressonância nuclear magnética, foram realizados para excluir lesões no VIII nervo craniano em pacientes que apresentaram DNS unilateral ou envolvimento do sistema nervoso central, e também naqueles em quem os resultados da audiometria de tronco cerebral (ABR) ou os dados clínicos fossem sugestivos de envolvimento retrococlear.

Exame físico otorrinolaringológico

O exame físico otorrinolaringológico consistiu em uma revisão da história clínica com o objetivo de detectar a presença, no passado ou no presente, de manifestações clínicas relevantes. Para tal utilizou-se um protocolo padronizado para todos os pacientes, que constava de exame otorrinolaringológico geral e exame audiológico e otoneurológico (Anexo 1).

O exame clínico foi caracterizado por inspeção e palpação da cabeça e pescoço, oroscopia, otoscopia, rinoscopia anterior e acumetria.

Exame audiológico

Estabeleceram-se as características audiológicas de acordo com a audiometria tonal e vocal convencional, com a determinação dos limiares ósseo-aéreos, tendo sido usada uma cabine acústica e um audiômetro modelo AD 17 da marca Interacoustics. Procedeu-se ainda à imitanciometria, que incluiu o estudo da timpanometria, dos reflexos estapedianos e da complacência estática, usando-se um imitanciômetro AZ 26 da marca Interacoustics.

Os pacientes do grupo de estudo realizaram o teste do glicerol, que foi considerado positivo quando houvesse melhora de 10 dB em três frequências (500, 1000 e 2000 Hz).

Exames otoneurológicos

A normalidade foi determinada pelo exame dos pares cranianos e eletroneistagmografia.

O exame dos pares cranianos foi realizado mediante pesquisa no II (acuidade visual, simetria e reação), III, IV e V (motricidade ocular, tamanho, simetria e reação das pupilas), V (reflexo corneano, sensibilidade da face e mucosa nasal), VII (motricidade facial), IX (motricidade e sensibilidade do pálato), X (motricidade do pálato), XI (movimentação dos músculos esternocleidomastoideo e trapézio) e XII (inspeção e motricidade da língua) pares cranianos. Seguiu-se a metodologia referida por Ganança e Mangabeira Albernaz²⁵.

O estudo eletroneistagmográfico foi realizado com um aparelho da marca Hortmann, modelo Neuro Otometrie, através de vários testes, seguindo a metodologia de Ganança e cols.²⁶.

Exames de busca etiológica

Foram realizados testes laboratoriais para avaliação de sorologia para sífilis, exame inespecífico para verificar a atividade inflamatória (velocidade de sedimentação globular, VSG), exames para avaliar coexistência de doenças imunológicas sistêmicas (fator antinuclear (FAN), fator reumatóide (FR), dosagem do complemento sérico : C3 e C4), pesquisa de alterações metabólicas através do perfil lipídico (colesterol total e frações, triglicerídeos) e curvas glicêmica e insulinêmica em jejum (de 10 a 16 horas) e após 100 g de glicose, em que os seguintes intervalos de tempo foram avaliados:

- concentração de glicose em 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos;
- concentração da insulina nos mesmos intervalos de tempo, pelo método do radioimunoensaio, e classificada de acordo com os critérios de Kraft²⁷.

Pesquisa de auto-anticorpos

O teste do anti-HSP70 foi realizado pelos métodos de ELISA e WB²⁸. O estudo foi duplo-cego: a equipe do laboratório testou os soros sem conhecimento do grupo a que pertenciam os pacientes encaminhados, e a equipe médica manejou os pacientes de acordo com o diagnóstico clínico, sem conhecimento do resultado do teste que foi realizado no Laboratório de Imunorreumatologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Os pacientes foram avaliados em relação ao tempo de início dos sintomas, presença de doença unilateral ou bilateral, idade e atividade da doença em associação com o resultado dos testes de ELISA e WB. Verificamos também se existe associação entre o anti-HSP70 e DM idiopática e DM de etiologia conhecida. Os dados foram plotados em planilha eletrônica Excel e analisados pelo Software estatístico SPSS 11.0.

Coleta de sangue e separação de célula

5 ml de sangue foram coletados, sendo 2 ml separados em tubo não heparinizado para coagulação e obtenção do soro, e o restante, transferido para tubos heparinizados. A seguir, esse sangue restante foi diluído em meio RPMI (Sigma) e centrifugado sobre Histopaque 1077 (Sigma) para a separação das células circulantes, que foram congeladas a -80 °C. O soro foi inicialmente mantido a 4 °C para as análises de auto-anticorpos, sendo adicionada azida a 0,01% para impedir o crescimento de microorganismos.

A metodologia para produção da HSP70 de origem humana e para a realização de WB e ELISA seguiram a descrição de Munari e cols.²⁸

Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado a partir de um estudo piloto. A fórmula para o cálculo foi baseada em Cochran²⁹. Para verificar a associação entre variáveis categóricas foram utilizados os testes qui-quadrado e exato de Fisher, quando apropriado. Para a

comparação de médias de variável contínua foi utilizado o teste t de Student. No caso de comparação da variável tempo de evolução (ordinal) foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A concordância entre os testes ELISA e WB foi verificada através do teste Kappa e qui-quadrado de McNemar. O nível de significância adotado foi de 0,05. A análise foi feita utilizando-se o *software* SPSS versão 11.0 e o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, assim como seus respectivos intervalos de confiança (95%), através do Epi Info 6.04d.

RESULTADOS

Características do grupo de estudo e do grupo controle

Entre os 31 pacientes do grupo de estudo com diagnóstico de DM, 12 eram homens (38,7%) e 19 eram mulheres (61,3%), com idade média de 39,5 anos (DP 15,5 anos, variando de 12 a 75 anos). A doença foi bilateral em 13 pacientes (41,9%), conforme a Tabela I.

O tempo entre o início dos sintomas e o primeiro exame ficou entre um e seis meses em um paciente (3,2%) e seis e 12 meses em um paciente (3,2%). Em 29 pacientes (93,6%) a avaliação ocorreu após 12 meses do início dos sintomas, conforme a Tabela II. O sintoma de plenitude aural esteve presente em 14 pacientes (45,2%). Oito pacientes (25,8%) tiveram história familiar sugestiva de DM. Quanto à atividade da doença, 21 (67,7%) pacientes não apresentavam doença ativa.

A queixa de zumbido esteve presente em todos os pacientes com DM (100%), sendo mais comum o zumbido unilateral agudo que ocorreu em 17 pacientes (54,8%). Todos os pacientes com DM realizaram o teste do glicerol, que foi positivo em 15 pacientes (48,4%). A eletroneistagmografia revelou hipoatividade do labirinto envolvido como o achado mais comum, encontrado em 20 (64,51%) pacientes, enquanto cinco (16,12%) tiveram o exame normal, três (9,67%) não conseguiram realizar o exame, dois (6,45%) apresentaram distúrbio misto e um (3,22%) apresentou hiperreflexia labiríntica.

Os pacientes com DOI na ausência de sintomas sugestivos de DM formaram um grupo controle de 78 pacientes, sendo constituído por 47 homens (60,3%) e 31 mulheres (39,7%), com idade média de 46,1 anos (desvio padrão de 15,9 anos, variando de 7 a 80 anos). A doença foi bilateral em 50 pacientes (64,1%), conforme a Tabela I. O tempo entre o início dos sintomas e o exame inicial foi de até 30 dias em quatro pacientes (5,1%), de um a seis meses em 12 (15,4%), de seis a 12 meses em oito (10,3%) e maior que um ano

em 54 pacientes (69,2%), conforme a Tabela II. A queixa de zumbido esteve presente em 61 pacientes (78,2%) com DOI, sendo mais comum o zumbido unilateral agudo que ocorreu em 43 (55,1%). O sintoma de plenitude aural esteve presente em 15 pacientes (19,2%). Quatro pacientes (5,1%) tiveram história familiar de perda auditiva. Quanto à atividade da doença 57(73,1%) não apresentavam doença ativa.

Todos os pacientes do grupo com DM apresentaram sintomas de vertigem típica em algum período desde o início das manifestações clínicas da doença. No momento da investigação, 27 pacientes (87,1%) referiam vertigem típica e quatro (12,9%) tontura não rotatória. No grupo controle, 41 pacientes (52,6%) nunca apresentaram queixas vestibulares, mas 10 (12,8%) referiram sintomas de vertigem típica, embora não preenchessem os critérios para DM, e 27 (34,6%), tontura não rotatória.

Quanto à disacusia, no grupo com DM 15 pacientes (48,4%) apresentavam DNS flutuante progressiva unilateral e sete (22,6%) flutuante progressiva bilateral. Nos demais pacientes não foi observada flutuação auditiva, mas sim DNS progressiva unilateral em dois (6,5%) e bilateral em seis (19,3%). Um paciente (3,2%) apresentou disacusia mista por apresentar DM decorrente de otosclerose. No grupo controle, quatro pacientes (5,1%) apresentavam DNS flutuante progressiva unilateral e cinco (6,4%) flutuante progressiva bilateral. Nos demais pacientes não foi observada flutuação auditiva, mas a DNS foi progressiva unilateral em cinco (6,4%), progressiva bilateral em sete (9%) e estável 45 pacientes (57,7%). Doze pacientes (15,4%) apresentaram disacusia mista com diagnóstico de otosclerose (Tabela III).

Três pacientes (9,7%) do grupo com DM foram submetidos a gentamicina intratimpânica, com controle dos sintomas da doença, sendo que todos apresentaram o anti-HSP70 positivo pelos métodos de ELISA e WB. Em relação a sorologia para sífilis, quatro

pacientes (5,1%) do grupo com DOI não DM e um paciente (3,2%) do grupo com DM apresentaram resultado positivo; entretanto, os testes não confirmaram doença ativa.

Quatro pacientes (12,9%) do grupo de estudo apresentavam doença auto-imune, 3 tireoidite de Hashimoto e 1 artrite reumatóide, em remissão.

Um paciente do grupo controle, cujo teste do anti-HSP70 foi negativo por ambos os métodos, apresentou anormalidade no exame de imagem, sendo diagnosticado neuroma do acústico. Os 78 pacientes do grupo controle tiveram várias hipóteses diagnósticas, conforme a Tabela IV.

Investigação etiológica no grupo de estudo

Quanto ao diagnóstico, os pacientes do grupo com DM foram submetido a exames de busca etiológica para avaliar a possibilidade de que a dismetabolopatia dos carboidratos fosse o fator causal da doença. Foram analisadas as curvas glicêmica e insulinêmica de cinco horas após 100 g de glicose em 30 pacientes (96,8%). Um (3,2%) não as realizou por não ter conseguido completar o exame. Nove pacientes (30%) tiveram curvas glicêmicas normais, seis (20%) com hiperglicemia e 15 com (50%) hipoglicemia. As curvas insulinêmicas foram normais em oito (26,6%) pacientes e anormais em 22 (73,4%), sendo que três (10%) foram do tipo II 1; 12 (40%) do tipo II 2; duas (6,7%) do tipo III b; e cinco (16,7%) do tipo IV, não sendo encontrada nenhuma curva do tipo V, considerando a classificação de Kraft²⁷. Contudo, três pacientes (10%) apresentaram curva glicêmica plana.

Os demais exames de busca etiológica realizados no grupo de estudo tiveram os seguintes resultados: três (9,7%) pacientes com alterações sorológicas sugestivas de hipotireoidismo e 11 (35,5%) com elevação do LDL colesterol. Nenhum dos pacientes com hipotireoidismo apresentou anti-HSP70 positivo, mas dois com elevação do colesterol

LDL tiveram anti-HSP70 positivo por WB. Um deles apresentou anticorpos também por ELISA.

A hipótese diagnóstica dos pacientes do grupo de estudo foi de 24 pacientes com DM por etiologia metabólica, um por otosclerose e três por otite média crônica, sendo que dois pacientes da casuística apresentam dois fatores causais para a doença: a otite média crônica e a dismetabolopatia dos carboidratos. Cinco pacientes não tiveram etiologia definida, conforme a Tabela V. Os pacientes com diagnóstico de otite média crônica não apresentavam supuração nem infecção na orelha média havia mais de três meses. Entre os cinco pacientes com etiologia idiopática, nenhum apresentou sorologia positiva para o HSP70.

Correlação dos achados da pesquisa etiológica com os métodos de pesquisa de auto-anticorpos (WB e ELISA)

Nos cinco pacientes com DM e etiologia indeterminada, a sorologia foi negativa nos dois testes. Nos quatro pacientes em que o ELISA foi positivo a etiologia da doença foi a dismetabolopatia dos carboidratos, e a DM foi unilateral. Em relação ao WB, nos oito pacientes com o teste positivo, a etiologia foi dismetabolopatia dos carboidratos com curvas tipo II ou III, mas uma paciente tinha história de artrite reumatóide e pseudogota, no passado, e estava sem tratamento há 6 meses. Entre os oito pacientes, cinco tiveram DM unilateral e três DM bilateral. Dois pacientes apresentavam mais de uma etiologia (dismetabolopatia dos carboidratos e otite média crônica). Estes últimos tiveram doença bilateral.

Testes imunológicos

Testes de imunidade inespecíficos

Os exames para avaliar atividade inflamatória (VSG) e imunidade inespecífica (FAN, FR, C4), não apresentaram nenhuma alteração, exceto em um (3,2%) paciente com

história de artrite reumatóide e pseudogota sem tratamento havia 6 meses, que apresentou a dosagem de C3 elevada com todos os outros exames laboratoriais realizados normais. No grupo controle, em 10 (14,1%) pacientes o VSG estava elevado. Contudo, os exames (FAN, FR, C3 e C4) foram normais.

Métodos de pesquisa de auto-anticorpos

O ELISA foi positivo em quatro (12,9%) pacientes e negativo em 27 (87,1%) pacientes do grupo com DM. Os resultados do grupo controle foram: 19 (24,4%) pacientes com resultados positivos e 59 (75,6%) negativos.

O WB foi positivo em oito (25,8%) pacientes com DM e negativo em 23 (74,2%). No grupo controle, 14 (17,9%) pacientes tiveram resultado positivo e 64 (82,1%), negativo.

No grupo com DM, o teste ELISA foi positivo em quatro (12,9%) pacientes e o WB foi positivo em oito (25,8%). Um paciente com ELISA positivo apresentava doença ativa, enquanto três pacientes com teste positivo apresentavam doença inativa. Quanto ao WB, dois pacientes tiveram resultado positivo com doença ativa, enquanto os outros seis com teste positivo não apresentavam doença ativa.

No grupo de estudo, quanto à lateralidade em relação ao anti-HSP70, todos os pacientes com teste ELISA positivo tiveram doença unilateral. No WB, dos oito pacientes com teste positivo, somente três tiveram doença bilateral. Três pacientes (9,7%) apresentaram ambos os testes positivos, todos com DM metabólica e submetidos a gentamicina intra-timpânica; 22 (71%) apresentaram ambos os testes negativos.

A concordância entre o ELISA e WB foi baixa (coeficiente de Kappa: 0,396)

Correlação dos testes de imunidade inespecífica em relação aos testes ELISA e WB

Os quatro pacientes do grupo de estudo com o teste de ELISA positivo e os oito pacientes com WB positivo não apresentaram alterações nos exames de atividade inflamatória.

No grupo controle, 10 pacientes tiveram VSG (exame de atividade inflamatória) alterado. Quanto ao diagnóstico etiológico dos 10 pacientes, um apresentava otosclerose, três DNS bilateral de etiologia desconhecida e seis surdez súbita. Dos 10 pacientes, cinco tiveram o resultado positivo com um ou ambos métodos de pesquisa de anti-HSP70. O anti-HSP70 por ELISA foi positivo em três, sendo que o diagnóstico de dois foi surdez súbita e de um DNS, bilateral de etiologia desconhecida. Quando ao WB, quatro pacientes tiveram anti-HSP70 positivo: dois com diagnóstico de surdez súbita, um de otosclerose e um de DNS bilateral de etiologia desconhecida. Dois (20%) pacientes com surdez súbita apresentaram exame positivo por ambos os métodos. A Tabela VI apresenta os principais resultados para cada um dos pacientes.

Investigação do anti-HSP70 em DM e DOI

Prevalência em DM e DOI com WB e ELISA. O método de WB revelou uma prevalência de 25,8% entre os pacientes com DM e de 17,9% no grupo controle. O ELISA revelou uma prevalência de 12,9% entre os pacientes com DM e de 24,4% no grupo controle.

Sensibilidade e especificidade do HSP70 (WB e ELISA) na definição de imunopatia em DM e DOI

Nos pacientes com DM, consideramos o diagnóstico clínico como o padrão áureo e comparamos os resultados dos testes de ELISA e WB em função disso. Utilizamos um intervalo de confiança de 95% em ambos os métodos de pesquisa de auto-anticorpos.

Quanto ao anti-HSP70 pelo método ELISA, a sensibilidade do teste foi de 12,9% (4,2; 30,8), a especificidade foi de 75,6% (64,4; 84,3), o valor preditivo positivo de 17,4% (5,7; 39,5) e o valor preditivo negativo de 68,6% (57,6; 77,9%), conforme Tabela VII.

Em relação ao anti-HSP70 pelo método de WB, a sensibilidade do teste foi de 25,8% (12,5; 44,9), a especificidade foi de 82,1% (71,4; 89,5), o valor preditivo positivo de 36,4% (18,0; 59,2) e o valor preditivo negativo de 73,6% (62,8; 82,2%), conforme a Tabela VIII.

DISCUSSÃO

Características do grupo de estudo e do grupo controle

Quanto à escolha do grupo controle, Soliman sugeriu que, em estudos para avaliar a validade de testes de auto-imunidade da OI, os controles com patologias otológicas são mais apropriados do que os pacientes saudáveis, não somente pacientes com presbiacusia, mas pacientes com perda auditiva idiopática não sugestiva de etiologia imunomediada³⁰. Os pacientes com outras doenças auto-imunes conhecidas e pacientes saudáveis poderiam ser também incluídos para avaliar especificidade do teste diagnóstico⁴⁷.

Em relação às características clínicas dos grupos avaliados, não observamos associação estatística entre a maior positividade nos testes de anti-HSP70 e a menor idade dos pacientes, como relatado por Garcia Berrocal e cols.³¹.

No grupo controle predominou a perda auditiva bilateral, enquanto que no grupo de estudo a doença unilateral foi mais freqüente. Houve diferença significativa entre os grupos quanto à lateralidade da doença. Acredita-se que a doença bilateral esteja mais frequentemente associada aos processos sistêmicos, portanto seria esperado que a presença de auto-anticorpos fosse mais prevalente na doença bilateral, conforme será discutido a seguir. No grupo de estudo predominou a disacusia flutuante progressiva, que ocorreu em

22 (71%) pacientes, dados semelhantes aos encontrados na literatura¹⁸. Um paciente com perda auditiva mista teve diagnóstico de otosclerose, causa potencial da DM.

A hiporreflexia do labirinto acometido foi o achado mais freqüente na eletronistagmografia, estando de acordo com os achados da literatura. Os dados quanto à plenitude aural, presença de zumbidos e características da vertigem foram semelhantes aos encontrados na literatura¹⁸.

Entre os pacientes avaliados no nosso estudo, 83 (76,1%) foram investigados mais de um ano após o início dos sintomas, fato que pode ter influenciado os títulos do anti-HSP70 conforme será discutido a seguir.

Os três (9,7%) pacientes submetidos a gentamicina ablativa intra-timpânica apresentaram a presença de anti-HSP70 por ambos os métodos. A elevação dos anticorpos anti-HSP70 pode ser decorrente da morte celular provocada pelo tratamento.

Os pacientes com sorologia para sífilis positiva não apresentavam resultado positivo ao repetirmos o exame, nem história de doença ativa, bem como nenhum apresentava FTA-ABs positivo, portanto, os sintomas vestibulococleares não podem ser atribuídos a esse possível fator causal.

Investigação etiológica no grupo de estudo

Quanto ao diagnóstico, os pacientes com curvas insulinêmicas do tipo II e III têm alta probabilidade de virem a se tornar diabéticos. Os nove pacientes com HSP70 positivo por um ou ambos os métodos apresentaram curvas insulinêmicas do tipo II e III, dois deles com hipoglicemia associada. A curva insulinêmica do tipo IV, com um valor em jejum maior que 50 U/l, é sugestiva de diabete melito. Embora nenhum paciente tenha apresentado curva tipo V, três pacientes apresentaram curva glicêmica plana, que freqüentemente está associada a distúrbio de absorção de açúcares (microvilopatia enzimática) decorrente da deficiência de enzimas, sendo a mais comum a deficiência de

lactase. Tais pacientes foram encaminhados para realizar curva de tolerância a lactose, mas somente um paciente realizou a curva e teve o diagnóstico confirmado. A etiologia mais prevalente nos pacientes com DM foi a dismetabolopatia dos carboidratos, dado que está de acordo com estudos anteriores³²⁻³⁴.

Correlação dos achados etiológicos com ELISA e WB

Os testes de pesquisa de auto-anticorpos foram realizados pelos métodos de ELISA e WB. Tais testes são denominados testes de imunidade específica, mas na verdade o anti-HSP70 não é específico para a OI.

Os cinco (16,1%) pacientes do grupo de estudo com etiologia idiopática apresentaram sorologia negativa no WB e no ELISA. Tal fato não era esperado, pois acreditava-se que os pacientes com doença de etiologia desconhecida poderiam apresentar um mecanismo imunomediado como fator causal para a doença, enquanto todos os pacientes com sorologia positiva tiveram uma definição etiológica. A análise estatística não mostrou associação entre a DM com etiologia conhecida e a presença de auto-anticorpos, conforme as Tabelas IX e X, talvez pelo tamanho reduzido da amostra.

Os dois pacientes do grupo de estudo com duas etiologias (otite média crônica e dismetabolopatia dos carboidratos) apresentaram WB positivo e doença bilateral. Uma teoria chamada cocleolabirintite solidária (*theory of sympathetic cochleolabyrinthitis*) sugere que a doença bilateral, em pacientes com doença crônica da orelha média unilateral, poderia ser decorrente da liberação de antígenos que ocorre durante o período de deterioração da audição, gerando uma resposta imune e conseqüente doença na orelha contralateral após infecção ou cirurgia na OI³⁵.

No grupo de estudo, o fato de nenhum dos três pacientes com hipotireoidismo apresentarem anti-HSP70 positivo chama a atenção, já que, sabidamente, as patologias da tireóide, como a tireoidite de Hashimoto, são doenças auto-imunes. Quanto aos dois

pacientes com elevação do colesterol LDL que tiveram anti-HSP70 positivo por WB ou ELISA, é possível que anticorpos contra o LDL oxidado (pelo processo de envelhecimento celular) sejam responsáveis pela formação da placa aterosclerótica. Entretanto, não é possível associar a presença dos auto-anticorpos com o LDL já que outros pacientes com auto-anticorpos anti-HSP70 tiveram colesterol LDL normais³⁶.

Testes imunológicos

Testes de imunidade inespecíficos

Em nossa casuística não foi observada correlação entre o resultado dos exames de atividade inflamatória e o anti-HSP70 no grupo de estudo. No grupo controle, dos 10 pacientes com resposta inflamatória inespecífica (VSG elevado), cinco tiveram anti-HSP70 positivo por ELISA ou WB, três tiveram resultado positivo somente por ELISA, quatro por WB, sendo que 2 foram positivos pelos dois métodos. Contudo, a análise estatística não determinou associação entre exames de atividade inflamatória e auto-anticorpos, conforme as Tabelas XI e XII. Os testes laboratoriais de imunidade inespecíficos não detectaram nenhum caso de doença auto-imune.

Embora os testes laboratoriais possam auxiliar na investigação da DOI imunomediada, o diagnóstico continua sendo baseado na melhora dos sintomas em resposta ao corticosteróide, que é considerada o padrão áureo pela falta de um teste com esta característica³⁷. Hirose e cols. avaliaram a utilidade dos testes laboratoriais nas DOI de provável etiologia imunomediada.³⁵ Em seu estudo, os pacientes analisados foram atendidos dentro de duas semanas do início dos sintomas otológicos e vestibulares. Tais autores concluíram que o teste sugerido para o diagnóstico de pacientes com manifestações clínicas de DOI imunomediada é o VSG, para detectar a presença de atividade inflamatória aguda. Somente quando o VSG for elevado são recomendados os testes de imunidade, como FAN, FR, C3 e C4, e, conforme a suspeita clínica, podem ser complementados com

exames adicionais. Nosso estudo demonstrou que a solicitação dos testes de imunidade citados anteriormente, na rotina de pesquisa etiológica sem sintomas de doença auto-imune, não se mostrou útil no diagnóstico, confirmando os achados de Hirose e cols.³⁵

Métodos de pesquisa de auto-anticorpos

Hirose e cols. concluíram também que na DOI imunomediada, além do VSG, o teste do anti-HSP70 por WB é sugerido para o diagnóstico da doença^{35,37}. Na nossa casuística não foi encontrada associação entre presença de auto-anticorpos (ELISA e WB), atividade da doença^{31,37} e doença bilateral³⁸ e não houve concordância entre os testes ELISA e WB (coeficiente de Kappa 0,396).

Quanto ao tempo de evolução vs. atividade da doença, o período de tempo entre o início das manifestações clínicas e a realização dos testes (ELISA e WB) foi maior do que um ano em 83 pacientes (76,1%). Quanto à atividade da doença, 78 pacientes (71,6%) apresentavam doença inativa. Comparando o grupo de estudo e o controle em relação a atividade e tempo de evolução da doença, não foi encontrada diferença significativa nem para WB nem para ELISA. O longo tempo de evolução da doença e o fato de que a maioria dos pacientes não tinham doença ativa poderia explicar os baixos índices de auto-anticorpos.

Garcia Berrocal e cols. realizaram um estudo para avaliar a validade do teste HSP70 WB em DM, surdez súbita e perda auditiva progressiva. O tempo médio decorrido entre o início da perda auditiva e o exame inicial dos pacientes avaliados foi de 32,6 meses para o grupo com DNS progressiva idiopática e 44,2 meses para a DM. O estudo tentou correlacionar presença de auto-anticorpos com atividade da doença, supondo que a presença do HSP70 é um fenômeno derivado do tempo de destruição tissular. Se a proteína de choque de calor é liberada em fases precoces do dano celular, ela não será detectada em fases mais avançadas do curso clínico da doença. Provavelmente, o grande intervalo de

tempo entre o início dos sintomas e o atendimento médico pode facilitar o bloqueio aos auto-anticorpos anti-HSP70, diminuindo a efetividade dessa análise mesmo em casos de doença ativa e levando a resultados negativos. Esse achado poderia revelar a importância do HSP70 na resposta imune local precoce decorrente da agressão tissular no ouvido interno³¹.

Garcia Berrocal argumentou, em outro estudo, que as DOI provavelmente decorrem de uma resposta imune celular, como foi encontrado em estudos experimentais, com o recrutamento de células inflamatórias junto à cóclea, fato que, associado a forma súbita da apresentação clínica, poderia não permitir a formação de anticorpos anti-HSP70¹⁴.

Mosciki estabeleceu os critérios clínicos para DOI progressiva imunomediada associada a presença de auto-anticorpos anti-HSP70 e resposta positiva ao corticosteróide. Ele encontrou resultados positivos em 89% dos pacientes com doença ativa nos três meses que antecederam o teste, comparado com nenhum resultado positivo nos 25 pacientes com doença inativa no mesmo período³⁷.

Quanto à lateralidade

A existência de DNS bilateral progressiva poderia facilitar a produção de auto-anticorpos anti-HSP70, porque o dano poderia afetar os dois ouvidos por um período maior (semanas ou meses), diferentemente da surdez súbita, em que a perda auditiva surge em horas a dias. O dano mais extensivo da lesão bilateral facilitaria a produção de auto-anticorpos anti-HSP70 durante a doença ativa; contudo, tais achados não foram confirmados³⁸.

Existe uma discussão sobre os sintomas comuns a DNS bilateral progressiva, surdez súbita e DM e sobre o fato de que nem sempre é possível diferenciar essas entidades com certeza somente pelas manifestações clínicas, já que não existem testes diagnósticos definitivos. Os pacientes que têm DNS sem uma suspeita etiológica merecem um

tratamento imunossupressor por possível etiopatogenia imunomediada. A surdez súbita é uma doença otológica distinta, caracterizada por DNS unilateral, que ocorre dentro de 72 horas, tratada com corticosteróide pela possibilidade de o processo patológico ser inflamatório ou imunológico. Há na literatura relatos sobre pacientes com surdez súbita inicialmente unilateral que desenvolvem DOI bilateral posteriormente, responsiva a tratamento imunossupressor³⁹.

Alguns autores acreditam que a maioria dos casos de DM tem patologia imunomediada, enquanto outros sugerem que a DNS bilateral rapidamente progressiva idiopática seria uma entidade diferente, que pode ser diferenciada da DM por apresentar envolvimento bilateral, rapidamente progressivo, predominância da perda auditiva sobre os sintomas vestibulares e resposta ao corticóide associada a presença de auto-anticorpos HSP70^{16,40}. Em pesquisa de Rahman e cols, muitos pacientes que responderam a terapia imunossupressora apresentam doença inicialmente unilateral. Da mesma forma, a DM bilateral não é incomum, podendo ser responsiva a corticóides e imunossupressores^{16,41}. As características clínicas dos pacientes com DM são compatíveis com uma condição imunomediada, envolvendo ambos os ouvidos em 30 a 60% dos pacientes acompanhados por longos períodos⁴².

Quanto à história natural da doença

Alguns fatos devem ser ressaltados quanto à evolução da doença. A sintomatologia de algumas enfermidades regride com tratamento antiinflamatório, portanto nem todos os pacientes que respondem ao corticosteróide têm doença imunomediada, como pode ocorrer inicialmente na otossífilis. Outro fator de confusão é o falso controle dos sintomas em pacientes que teriam melhora espontânea independente do tratamento. Hirose e cols. sugerem que a resposta a corticosteróide deve ser considerada positiva quando for necessário manter o tratamento por longos períodos para evitar a progressão da DOI³⁵. Um

exemplo disso é que cerca de 10% dos pacientes com DM apresentam melhora dos sintomas ao receber corticosteróides³⁹.

Considerações sobre o método do WB comparado ao ELISA

Algumas questões devem ser discutidas em relação ao teste do anti-HSP70 por WB. O primeiro foi que o teste era positivo em alguns pacientes quando testados contra um lisado celular inteiro e negativos quando o antígeno era purificado. O segundo fato relevante foi que se grandes quantidades de HSP70 purificado fossem usadas os pacientes e os controles seriam positivos.

O principal problema do WB no rastreamento de DOI é o uso de lisado celular inteiro, potencialmente levando a resultados falsos positivos, já que outras proteínas de 70 kD, que na verdade não são o HSP70, são reconhecidas. No estudo que publicamos em 2003, verificamos que a quantidade de HSP70 presente é crítica no WB, e que altas quantidades de HSP70, mesmo em normais, podem revelar um teste positivo. No presente estudo usamos a proteína recombinante na realização de ambos os métodos (ELISA e WB)⁴³. Na verdade, o anti-HSP70 está presente em baixos níveis em todas as pessoas. Outro problema é a desnaturação da proteína, que impossibilita o reconhecimento do anticorpo no soro do paciente³⁰.

Um terceiro e mais sério problema é a falta de pureza do antígeno associado ao fato de o soro do paciente e controle apresentarem anticorpos reativos a outros antígenos presentes no extrato bruto, como a albumina bovina, que tem um peso molecular ligeiramente menor do que 68 kDa, freqüentemente distorcendo essa região do *blot*²⁸. A solução para o problema da impureza dos antígenos seria a realização dos testes com proteína recombinante⁴³. Os resultados sugerem que o WB não é um método adequado para identificar auto-anticorpos para a HSP70, sendo o ELISA uma alternativa mais confiável no diagnóstico²⁸.

O teste ELISA é semi-quantitativo e, portanto, mais apropriado para identificar resultados positivos e negativos. A proteína de OI humana, mostrou-se mais sensível no estudo piloto realizado em pacientes com DNS progressiva, necessitando menores quantidades de concentração de antígenos e, assim, minimizando falsos positivos²⁸.

Algumas doenças auto-imunes estão associadas com auto-anticorpos que não são específicos para órgãos e tecidos, de forma que pode ser difícil estabelecer a significância da positividade do auto-anticorpo na etiologia da doença. O estudo de Shin e cols. revelou uma maior prevalência de anti-HSP70 no soro de pacientes com DM do que em controles, embora o auto-anticorpo não seja específico da OI⁴⁴. A dúvida em relação à função dos auto-anticorpos permanece. Não sabemos se a DOI é uma manifestação da resposta imune contra a produção aumentada de HSP70 ou se os auto-anticorpos seriam um epifenômeno da doença, que pode estar associado a outros fatores causais como cirurgia prévia ou infecção viral, não sendo o HSP70 necessariamente relacionado à etiologia da doença^{41,44,45}.

Prevalência do HSP70 em DM e DOI

O WB revelou uma prevalência no grupo com DM (25,8%) maior em relação ao teste ELISA (12,9%). No grupo controle, a prevalência foi de 17,9% e 24,4%, respectivamente. Contudo, não foi encontrada significância estatística em tais achados e, portanto, os testes não demonstraram utilidade clínica na DM.

Sensibilidade e especificidade do HSP70 (WB e ELISA) na definição da imunopatologia em DM e DOI

Em estudo publicado por Harris e cols., o teste do anti-HSP70 pelo método WB apresentou sensibilidade de 42%, especificidade de 90% e valor preditivo positivo de 91% para pacientes com resposta positiva ao corticóide, ou seja, preenchiam os critérios para DOI imunomediada e tiveram melhora pelo uso do tratamento imunossupressor. Segundo

os autores, pacientes com resultados negativos no WB poderiam também se beneficiar de corticóides pela baixa sensibilidade do teste. Entretanto, os pacientes nesse estudo foram tratados em menos de duas semanas do início dos sintomas, período em que a doença estava em atividade¹¹. Atlas e cols. também referem que a presença desses anticorpos foi significativamente relacionada com a doença ativa⁴⁰.

O estudo de Munari e cols. avaliou os resultados do método de ELISA em 13 pacientes com DOI imunomediada e em 30 controles e encontrou sensibilidade de 84%, especificidade de 93%, valor preditivo positivo de 84% e valor preditivo negativo de 92,8%, superiores aos relatados pelo método WB e, portanto, com melhor valor diagnóstico²⁸.

Rahman e cols. relatam que cerca de um terço dos pacientes com DM apresentam auto-anticorpos anti-HSP70 positivos pelo método de WB¹⁶. Rauch e cols. também encontraram associação entre anti-HSP70 e DM²⁴.

Na nossa casuística, no grupo de estudo, a sensibilidade e o valor preditivo positivo dos testes foram baixos, enquanto que a especificidade e o valor preditivo negativo foram altos. Estas características em um teste diagnóstico sugerem que ele é útil para confirmação diagnóstica. Contudo, não podemos fazer tais afirmações em relação ao teste do anti-HSP70 por ELISA e WB em pacientes com DM, já que não foi encontrada significância na análise estatística (conforme Tabelas VII e VIII) entre os grupos e os testes.

Considerações sobre a origem das proteínas para o teste

O estudo imunológico das DOI requer que os antígenos purificados de OI estejam prontamente acessíveis. As proteínas da OI têm sido extraídas de humanos e mamíferos e usadas em estudos de investigação clínica e estudos experimentais⁴⁶. O teste do anti-HSP70 parece clinicamente útil, segundo alguns estudos; entretanto, obter o antígeno para o teste pode ser difícil e consumir bastante tempo⁴⁴. A coleta do tecido da OI humana é

usualmente realizada durante cirurgias translabirínticas de neuroma do acústico. Entretanto, a quantidade é limitada e, além disso, e o tecido não pode ser totalmente retirado durante a cirurgia. Portanto, é razoável que outros tecidos de OI de mamíferos sejam usados em substituição ao humano. O tecido de cobaias é abundante e pode ser obtido inteiro pela dissecação cirúrgica da OI⁴⁶. Por outro lado, o restrito volume do tecido de cobaias obtido aumenta o custo. Essa dificuldade na obtenção do antígeno pode ser resolvida seguindo as observações de Yamanobe e Harris³⁹. Shin argumenta que o antígeno de 68 kDa é ubíquo e, assim, mais acessível e abundante em outros locais, tais como cérebro ou rim, que seriam possíveis fontes do antígeno⁴⁴. Um estudo prévio mostrou que as preparações antigênicas obtidas de ossos temporais de cadáveres humanos e ossos temporais bovinos mostram bandas similares na análise do SDS-PAGE³⁹.

Cao e cols. afirmam que em muitos estudos as proteínas são extraídas do tecido da OI inteira, quando o mais correto seria fracionar as proteínas, já que cada componente da OI têm uma estrutura histológica e função fisiológica particular, podendo ter diferente antigenicidade. Seria importante identificar em que componentes da OI os epítomos antigênicos estão localizados e quais as interações entre antígenos e anticorpos que podem ser relevantes para a patogênese da DOI imunomediada. Eles argumentam que seria conveniente que os antígenos diferentes de cada porção da OI fossem purificados e que a seqüência de aminoácidos fosse estudada⁴⁶.

Embora Moscicki e cols. tenham encontrado associação entre a proteína de 68 kD e DOI imunomediada³⁷, Cao e cols. somente observaram reatividade nas bandas de 42 e 58 kD⁴⁶. Essas foram principalmente encontradas no ligamento espiral e estria vascular. Entretanto, a de 42 kD não reagiu com o soro dos pacientes com DOI. A banda de 30 kD foi encontrada no órgão de Corti, gânglio espiral e fibras do nervo acústico e reagiu com o soro de pacientes com várias DOI⁴⁶. Yamanobe e Harris demonstraram que o soro dos

pacientes com DNS idiopática reagiram com as proteínas de 47, 50, 55, 62 e 68 kD em todos os tecidos bovinos estudados (não órgão-específicas), e com as proteínas órgão-específicas de 58, 60 e 220 kD na OI e rim, e 32 e 33 a 35 kD em componentes da OI³⁹. As discrepâncias em termos de peso molecular estimado das bandas de proteínas entre o estudo de Yamanobe e Harris e o de Cao e cols. podem ser devidas aos animais de experimentação serem diferentes (respectivamente boi e cobaia), bem como técnicas de extração ou emprego de proteínas padrão distintas⁴⁶. Os artigos citados pelos autores reforçam a idéia que a identificação destes auto-anticorpos pode representar um epifenômeno, e não têm relação com a etiologia da perda auditiva^{39,46}.

Certamente o longo tempo entre o início dos sintomas e a realização da pesquisa de auto-anticorpos pode diminuir a reatividade dos testes. Além disso, cinco pacientes com DM de etiologia indefinida apresentaram os testes de ELISA e WB negativos. A análise estatística entre os grupos de estudo e controle não estabeleceu qualquer associação entre idade, sexo, características clínicas da DM e os achados sorológicos da pesquisa do anti-HSP70 por ELISA e WB, sugerindo que os testes não tiveram utilidade clínica para o diagnóstico da doença.

O valor prognóstico e terapêutico dos auto-anticorpos anti-HSP70 nas DOI, entre elas a DM, ainda não foi estabelecido. Somente estudos prospectivos com maior número de pacientes de diferentes subgrupos da DM permitirão que se determine se tais subgrupos da doença originam-se a partir de mecanismos patogênicos diferentes e se realmente há participação da resposta imune nesse processo. Acreditamos que a melhor compreensão da fisiopatogenia das DOI imunomediadas possibilitará o desenvolvimento de exames laboratoriais e critérios diagnósticos e de inclusão corretos.

CONCLUSÃO

- A detecção de auto-anticorpos anti-HSP70 por ELISA e *Western blot* não ocorreu em frequência significativamente diferente em DM que em DOI não Ménière.

REFERÊNCIAS

1. Atkinson M. Ménière's original papers. Reprinted with an English translation together with commentaries and biographical sketch. *Acta Otolaryngol [Suppl]* (Stockh). 1961; 162.
2. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113(3):181-5.
3. Hughes GB. Ménière's disease. *Hearing Health.* 2001;17:2.
4. Cahali S, Cahali MB, Lavinsky L, Cahali RB. Hidropsia endolinfática. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 479-85.
5. Merchant SN, Rauch SD, Nadol JB Jr. Ménière's disease. *Eur Arch Othorhinolaryngol.* 1995;252(2):63-75.
6. Ruckenstein MJ. Immunologic aspects of Ménière's disease. *Am J Otolaryngol.* 1999;20(3):161-5.
7. Stone JH, Francis HW. Immune-mediated inner ear disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(1):32-40.
8. Paparella MM, Djalilian HR. Etiology, pathophysiology of symptoms and pathogenesis of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 2002;35(3):529-45.
9. Mouadeb DA, Ruckenstein M. Antiphospholipid inner ear syndrome. *Laryngoscope.* 2005;115(5):879-83.
10. Oliveira do Valle L, Almeida CI, Alves FR, Breuel ML. Perda Auditiva Progressiva. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 346-66.

11. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*. 1990;100(5):516-24.
12. Nina LG, Lourenço EA. Doenças imunomediadas da orelha interna. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia*. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 140-47.
13. Proctor CA, Proctor TB, Proctor B. Etiology and treatment of fluid retention (hydrops) in Ménière syndrome. *Ear Nose Throat J*. 1992;71(12):631-5.
14. Garcia Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Immune response and immunopathology of inner ear: um update. *J Laryngol Otol*. 2000;114(2):101-7.
15. Yimtae K, Song H, Billings P, Harris JP, Keithley EM. Connection between the inner ear and the lymphatic system. *Laryngoscope*. 2001;111(9):1631-35.
16. Rahman M, Poe D, Choi H. Autoimmune vestibulo-cochlear disorders. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13(3):184-9.
17. Paparella MM. The cause (multifactorial inheritance) and pathogenesis (endolymphatic malabsorption) of Meniere's disease and its symptoms (mechanical and chemical). *Acta Otolaryngol*. 1985;99(3-4):445-51.
18. da Costa SS, de Sousa LC, Piza MR. Meniere's disease: overview, epidemiology, and natural history. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002;35(3):455-95.
19. Ruckenstein MJ. Autoimmune ear disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;12(5):426-30.
20. Derebery MJ. The role of allergy in Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am*. 1997;30(6):1007-15.
21. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. *Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999. p. 79-87.

22. Pearson BW, Brackmann DE. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for reporting treatment results in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1985;93(5):579-81.
23. Derebery MJ. Prevalence of heat shock protein in patients with Ménière's disease and allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;126(6):677-82.
24. Rauch SD, Zurakowski D, Bloch DB, Bloch K. Anti-heat shock protein 70 in Ménière's disease. *Laryngoscope.* 2000;110(9):1516-20.
25. Ganança MM, Mangabeira Albernaz PL. Da frequência nistágmica a prova calórica pendular decrescente, estudo eletroneistagmográfico em indivíduos normais. Cádiz, Anais do Simpósio Iberoamericano de Otoneurologia, 1976.
26. Ganança MM, Munhoz MSL, Caovilla HH, da Silva MLG. As etapas da Equilibrimetria. In: *Equilibrimetria clínica.* Vol 1. Rio de Janeiro: Atheneu; 1999. p. 41-96.
27. Kraft JR. Detection of diabetes mellitus in situ (occult diabetes). *Lab Med.* 1975;6:10-22.
28. Munari L, Charcat S, Rodrigues L, von Muhllen CA, Bau AR, Lavinsky L, Bonorino C. An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *J Immunol Methods.* 2003;283(1-2):155-61.
29. Cochran WG. *Sampling techniques.* New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1977.
30. Soliman AM. Immune-mediated inner ear disease. *Am J Otol.* 1992;13(6):575-79.
31. Garcia Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope.* 2002;112(2):304-9.
32. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin, and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.

33. Lavinsky L, D'Ávila C. Tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos com repercussão otológica. In: Lavinsky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 373-77.
34. Lavinsky L, Lavinsky J, D'Ávila C. Tratamento das principais disacusias neurossensoriais de causa sistêmica. In: Lavinsky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 415-25.
35. Hirose K, Wener MH, Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope*. 1999;109(11):1749-54.
36. Rubin W. Tratamento das doenças sistêmicas com repercussão otoneurológica. In: Lavinsky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 557-63.
37. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB Jr, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticoid treatment. *JAMA*. 1994;272(8):611-6.
38. Saeed SR, Birzgalis AR, Ramsden R. Ménière's disease. *Br J Hosp Med*. 1994;51(11):603-12.
39. Yamanobe S, Harris JP. Inner ear-specific autoantibodies. *Laryngoscope*. 1993;103(3):319-25.
40. Atlas MD, Chai F, Boscatto L. Meniere's disease: evidence of an immune process. *Am J Otol*. 1998;19(5):628-31.
41. Rahman M, Poe D, Choi H. Etanercept therapy for immune-mediated cocleovestibular disorders: preliminary results in a pilot study. *Otol Neurotol*. 2001;22(5):619-24.
42. Shea JJ. Autoimmune sensorineural hearing loss as aggravation factor in Ménière's: a preliminary report. *Adv Otorhinolaryngol*. 1983;30:254-7.

43. Mehlert A, Young DB. Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71kD antigen, a member of the 70kD heat-shock protein family. *Mol Microbiol.* 1989;3(2):125-30.
44. Shin SO, Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Comparison of anti-heat shock protein 70 and anti-68 kDa inner ear protein in the sera of patients with Ménière's disease. *Laryngoscope.* 1997;107(2):222-7.
45. Harris JP. Immunology of inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1984;193:147-62.
46. Cao MY, Deggouj N, Gersdorff M, Tomasi JP. Guinea pig inner ear antigens: extraction and application to the study of human autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope.* 1996;106(2 Pt 1):207-12.
47. Dornhoffer JL, Arenberg IK. Immune Mechanisms in Meniere's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 1997;30(6):1017-26.

Tabela I. Pacientes segundo grupo e lateralidade

Lateralidade	Ménière		DOI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Unilateral	18	58,1	28	35,9	46	42,2
Bilateral	13	41,9	50	64,1	63	57,8
Total	31	100,0	78	100,0	109	100,0

Teste qui-quadrado: p-valor = 0,008

Tabela II. Pacientes segundo grupo e tempo de evolução da doença

Tempo	Ménière		DOI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Até 30 dias	0	0,0	4	5,1	4	3,7
De 1 a 6 meses	1	3,2	12	15,4	13	11,9
De 6 a 12 meses	1	3,2	8	10,3	9	8,3
Mais de 1 ano	29	93,6	54	69,2	83	76,1
Total	31	100,0	78	100,0	109	100,0

Teste de Mann-Whitney: p-valor = 0,007

Tabela III. Pacientes segundo grupo e tipo de disacusia

Disacusia	Ménière		DOI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Flutuante progressiva unilateral	15	48,4	4	5,1	19	17,4
Flutuante progressiva bilateral	7	22,6	5	6,4	12	11,0
Progressiva unilateral	2	6,5	5	6,4	7	6,4
Progressiva bilateral	6	19,3	7	9,0	13	11,9
DNS estável	0	0,0	45	57,7	44	40,4
Mista	1	3,2	12	15,4	14	12,9
Total	31	100,0	78	100,0	109	100,0

DNS = disacusia neurosensorial.

Tabela IV. Pacientes do grupo controle segundo diagnóstico

Diagnóstico	DOI	
	n	%
DNS etiologia desconhecida bilateral	23	29,5
Surdez súbita	14	17,9
Presbiacusia	11	14,1
Ototoxicidade por medicamentos	2	2,6
Perda induzida por ruído	1	1,3
Neuroma acústico	1	1,3
Acidente vascular cerebral	2	2,6
Otosclerose	12	15,4
Quadro hidrópico transitório	2	2,6
Arnold Chiari	1	1,3
DNS etiologia desconhecida unilateral	9	11,5
Total	78	100,0

DNS = disacusia neurosensorial.

Tabela V. Pacientes do grupo de estudo (DM) conforme diagnóstico

Diagnóstico	n
DM metabólica	24
DM idiopática	5
DM por otite crônica	3
DM por otite crônica e metabólica	2
DM por otosclerose	1

DM = doença de Ménière.

Tabela VI. Principais resultados para cada paciente individualmente

Grupo	Idade	Sexo	Lateralidade	Atividade	Tempo		ELISA	WB	VSG ^a	Diagnóstico ^b
					evolução	(meses)				
DM	46	masc	unilateral	inativo	>12	positivo	positivo	1	Metabólico	
DM	57	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Otosclerose	
DM	22	fem	bilateral	inativo	>12	negativo	positivo	1	OMC/ Metabólico	
DM	28	fem	bilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	27	fem	bilateral	ativo	>12	negativo	positivo	1	Metabólico	
DM	28	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	38	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	57	masc	bilateral	ativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	12	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	27	fem	bilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Idiopático	
DM	45	fem	bilateral	inativo	>12	negativo	positivo	1	OMC/ Metabólico	
DM	12	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	38	masc	unilateral	inativo	>12	positivo	negativo	1	Metabólico	
DM	24	fem	unilateral	ativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	32	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	63	fem	bilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Idiopático	
DM	48	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	51	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	positivo	1	Metabólico	
DM	56	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	positivo	1	Metabólico	
DM	25	masc	unilateral	inativo	>12	positivo	positivo	1	Metabólico	
DM	21	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	57	fem	bilateral	ativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	44	fem	bilateral	ativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	39	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Idiopático	
DM	30	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	37	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	43	fem	bilateral	ativo	>12	negativo	negativo	1	Idiopático	
DM	40	masc	bilateral	ativo	>12	negativo	negativo	1	Metabólico	
DM	40	fem	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	OMC	
DM	63	masc	bilateral	ativo	1-6	negativo	negativo	1	Idiopático	
DM	75	masc	unilateral	ativo	6-12	positivo	positivo	1	Metabólico	
DOI	16	masc	unilateral	inativo	1-6	negativo	negativo	1	DNS unilateral	

^a 1 = normal; 2 = alterado.

^b DNS bilateral ou DNS unilateral indicam etiologia desconhecida, em investigação. OMC = otite média crônica.

Tabela VI. Principais resultados para cada paciente individualmente

Grupo	Idade	Sexo	Lateralidade	Atividade	Tempo		ELISA	WB	VSG ^a	Diagnóstico ^b
					evolução	(meses)				
DOI	67	masc	unilateral	inativo		1-6	positivo	negativo	1	Surdez súbita
DOI	52	fem	bilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	1	AVC
DOI	30	fem	bilateral	inativo		>12	positivo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	61	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Ototoxicidade
DOI	51	masc	unilateral	inativo		>12	positivo	negativo	1	DNS unilateral
DOI	28	fem	unilateral	inativo		>12	positivo	negativo	1	Surdez súbita
DOI	80	masc	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Surdez súbita
DOI	65	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	65	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	53	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	41	masc	unilateral	inativo		>12	negativo	positivo	1	DNS unilateral
DOI	38	fem	unilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	1	DNS unilateral
DOI	54	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	positivo	2	DNS bilateral
DOI	57	fem	bilateral	inativo		6-12	positivo	negativo	1	Ototoxicidade
DOI	38	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Otosclerose
DOI	55	fem	bilateral	ativo		>12	positivo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	42	masc	bilateral	inativo		>12	positivo	negativo	2	DNS bilateral
DOI	58	masc	bilateral	ativo		>12	negativo	positivo	2	Otosclerose
DOI	7	masc	bilateral	inativo		>12	positivo	negativo	1	Otosclerose
DOI	59	fem	bilateral	inativo		1-6	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	40	fem	bilateral	ativo		>12	negativo	negativo	2	DNS bilateral
DOI	65	masc	bilateral	ativo		>12	positivo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	45	masc	unilateral	ativo		< 30 dias	positivo	positivo	2	Surdez súbita
DOI	54	masc	unilateral	ativo		< 30 dias	positivo	positivo	2	Surdez súbita
DOI	8	fem	bilateral	ativo		>12	positivo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	63	fem	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Neuroma
DOI	45	fem	bilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	60	masc	bilateral	inativo		1-6	negativo	positivo	1	DNS bilateral
DOI	63	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	positivo	1	Presbiacusia
DOI	35	fem	bilateral	ativo		>12	negativo	positivo	1	Otosclerose
DOI	48	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	positivo	1	Presbiacusia
DOI	77	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Presbiacusia

^a 1 = normal; 2 = alterado.

^b DNS bilateral ou DNS unilateral indicam etiologia desconhecida, em investigação. OMC = otite média crônica.

Tabela VI. Principais resultados para cada paciente individualmente

Grupo	Idade	Sexo	Lateralidade	Atividade	Tempo		ELISA	WB	VSG ^a	Diagnóstico ^b
					evolução	(meses)				
DOI	43	masc	unilateral	inativo		1-6	positivo	negativo	1	DNS unilateral
DOI	58	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	positivo	1	Presbiacusia
DOI	63	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	positivo	1	AVC
DOI	50	masc	bilateral	inativo		1-6	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	9	fem	unilateral	inativo		>12	positivo	negativo	1	Surdez súbita
DOI	59	masc	bilateral	ativo		>12	negativo	negativo	1	Otosclerose
DOI	60	fem	bilateral	ativo		1-6	negativo	negativo	1	Otosclerose
DOI	30	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	50	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	58	fem	bilateral	ativo		1-6	positivo	negativo	1	Otosclerose
DOI	45	fem	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	PAIR
DOI	40	fem	bilateral	ativo		1-6	positivo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	28	masc	unilateral	ativo		>12	negativo	negativo	2	Surdez súbita
DOI	44	masc	bilateral	ativo		>12	negativo	negativo	1	Otosclerose
DOI	40	masc	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Surdez súbita
DOI	60	fem	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS unilateral
DOI	56	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	42	masc	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS unilateral Hidropisia
DOI	34	fem	unilateral	inativo		1-6	negativo	negativo	1	transitória
DOI	46	masc	bilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	35	masc	bilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	60	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	Presbiacusia
DOI	30	fem	bilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	1	Otosclerose
DOI	45	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	45	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS bilateral
DOI	15	masc	bilateral	inativo		>12	negativo	positivo	1	DNS bilateral
DOI	63	fem	unilateral	inativo		6-12	negativo	negativo	2	Surdez súbita
DOI	44	masc	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS unilateral
DOI	26	masc	unilateral	ativo		6-12	negativo	negativo	2	Surdez súbita
DOI	69	masc	unilateral	inativo		>12	negativo	negativo	1	DNS unilateral
DOI	37	masc	bilateral	ativo		>12	negativo	negativo	1	Otosclerose

^a 1 = normal; 2 = alterado.

^b DNS bilateral ou DNS unilateral indicam etiologia desconhecida, em investigação. OMC = otite média crônica.

Tabela VI. Principais resultados para cada paciente individualmente

Grupo	Idade	Sexo	Lateralidade	Atividade	Tempo		ELISA	WB	VSG ^a	Diagnóstico ^b
					evolução	(meses)				
DOI	54	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Surdez súbita	
DOI	35	masc	unilateral	inativo	>12	negativo	negativo	1	Surdez súbita	
DOI	50	masc	unilateral	inativo	6-12	negativo	negativo	1	Arnold Chiari	
DOI	30	fem	bilateral	ativo	6-12	negativo	negativo	1	Otosclerose	
DOI	46	masc	unilateral	inativo	6-12	negativo	negativo	2	Surdez súbita	
DOI	44	fem	unilateral	inativo	< 30 dias	negativo	negativo	1	Surdez súbita	
DOI	52	masc	unilateral	ativo	6-12	negativo	negativo	1	Otosclerose	
DOI	58	masc	bilateral	inativo	6-12	negativo	negativo	1	DNS bilateral	
DOI	15	fem	bilateral	ativo	< 30 dias	negativo	negativo	1	DNS bilateral Hidropisia	
DOI	40	masc	unilateral	inativo	6-12	negativo	negativo	1	Transitória	
DOI	32	masc	bilateral	inativo	1-6	negativo	negativo	1	DNS bilateral	
DOI	26	masc	bilateral	ativo	6-12	positivo	negativo	1	DNS bilateral	
DOI	38	fem	bilateral	inativo	1-6	positivo	positivo	1	DNS bilateral	
DOI	70	fem	bilateral	ativo	1-6	positivo	positivo	1	DNS bilateral	

^a 1 = normal; 2 = alterado.

^b DNS bilateral ou DNS unilateral indicam etiologia desconhecida, em investigação. OMC = otite media crônica.

Tabela VII. Pacientes segundo grupo e ELISA

Elisa	Ménière		DOI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	4	12,9	19	24,4	23	21,1
Negativo	27	87,1	59	75,6	86	78,9
Total	31	100,0	78	100,0	109	100,0

Teste qui-quadrado: p-valor = 0,186

Tabela VIII. Pacientes segundo grupo e WB

WB	Ménière		DOI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	8	25,8	14	17,9	22	20,2
Negativo	23	74,2	64	82,1	87	79,8
Total	31	100,0	78	100,0	109	100,0

Teste qui-quadrado: p-valor = 0,356

WB = Western blot.

Tabela IX. Pacientes segundo diagnóstico e ELISA

Diagnóstico	ELISA					
	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Idiopática	0	0,0	5	18,5	5	16,1
Causa definida	4	100,0	22	81,5	26	83,9
Total	4	100,0	27	100,0	31	100,0

Teste exato de Fisher: p-valor = 1,000

Tabela X. Pacientes segundo diagnóstico e WB

Diagnóstico	WB					
	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Idiopática	0	0,0	5	21,7	5	16,1
Causa definida	8	100,0	18	78,3	26	83,9
Total	8	100,0	23	100,0	31	100,0

Teste exato de Fisher: p-valor = 0,2912

Tabela XI. Pacientes do grupo controle segundo VSG e ELISA

VSG	ELISA					
	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Alterado	3	15,8	7	11,9	10	12,8
Normal	16	84,2	52	88,1	68	87,2
Total	19	100,0	59	100,0	78	100,0

Teste exato de Fisher: p-valor = 0,6986.

VSG* = velocidade de sedimentação globular.

* Considerado alterado quando acima de 15 em homens e acima de 20 em mulheres.

Tabela XII. Pacientes do grupo controle segundo VSG e WB

VSG	WB					
	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Alterado	4	28,6	6	9,4	10	12,8
Normal	10	71,4	58	90,6	68	87,2
Total	14	100,0	64	100,0	78	100,0

Teste exato de Fisher: p-valor = 0,0734

VSG* = velocidade de sedimentação globular; WB = Western blot.

* Considerado alterado quando acima de 15 em homens e acima de 20 em mulheres.

4.2. Artigo em língua inglesa

FREQUENCY OF AUTOANTIBODIES ANTI-HSP70 MEASURED WITH ELISA AND WESTERN BLOT IN PATIENTS WITH MÉNIÈRE'S DISEASE: A CONTROLLED STUDY

Anne-Rose L. Wiederkehr Baú*, **Luiz Lavinsky**²**, **Cristina Bonorino*****, **Leonardo Munari******

* Otorhinolaryngology Service of the Clinics Hospital of Porto Alegre, Brazil

** PhD. Otorhinolaryngology Service of the Clinics Hospital of Porto Alegre, Brazil

***PhD. Immunorheumatology Laboratory of the Biomedical Research Institute of PUCRS, Brazil.

**** Immunorheumatology Laboratory of the Biomedical Research Institute of PUCRS, Brazil.

Abridged title: **Anti-HSP70 in Ménière's disease**

²Corresponding Author: Luiz Lavinsky, Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-3330.2444, e-mail: lavinsky.ez@terra.com.br

ABSTRACT

Objectives: To establish the frequency of anti-HSP70 autoantibodies using the ELISA and the Western blot methods and compare the results of each method in patients with Ménière's Disease (MD) or non-Ménière inner ear diseases (IED).

Study design: Prospective case-control study with patients with MD and non-Ménière IED.

Methods: Blood samples were collected from 31 patients with MD and 78 patients with non-Ménière IED and tested for the presence of HSP70 using ELISA and Western blot. Data regarding cochlear and vestibular symptoms were collected.

Results: In the MD group, the onset of symptoms occurred more than one year before laboratory testing in 93.6% of the patients, with predominance of unilateral disease (58.1%). HSP70 was identified in four patients (12.9%) with ELISA and in eight patients (25.8%) with WB. Only one patient with positive ELISA result presented active disease. In Western blot-positive patients, two presented active disease and six presented inactive disease. Statistical analyses did not establish any association between serologic findings and MD clinical features. In the IED group, 64.1% presented bilateral disease. No association was found between disease laterality, duration and activity and anti-HSP70 autoantibodies.

Conclusion: The detection of auto-antibodies via ELISA or the WB did not take place at a higher frequency in the group of patients with MD than in the group of patients with IED.

Key words: Ménière's disease; anti-heat shock protein; endolymphatic sac; immune system; inner ear disease; sensorineural hearing loss.

INTRODUCTION

In 1861, Prosper Ménière described a clinical entity caused by alterations in the homeostasis of the inner ear (IE). Ménière's disease (MD), as it came to be known, is associated with sensorineural hearing loss (SNHL), vertigo episodes lasting from twenty minutes to hours and tinnitus in the absence of neurological symptoms.^{1,2} A pattern of remissions and exacerbations and a varied clinical presentation make the management of MD challenging and often frustrating.³

The histopathology of endolymphatic hydrops was initially described by Hallpike and Cairns in England and by Yamakawa in Japan. The term endolymphatic hydrops refers to an alteration in the IE arising from the progressive distension of the endolymphatic space, especially of the cochlear duct and saccule, although the utricle and the *crista ampullaris* of the semicircular canal may also be involved.⁴⁻⁶ If the cause of hydrops cannot be identified it is classified as MD, whereas cases with known etiology are classified as Ménière's syndrome (MS).^{7,8}

Historically, much research has been focused on MD. Nevertheless, the therapeutic alternatives are still limited.⁹ The etiology of MD is still unknown, as is the case with other IE disorders, such as sudden hearing loss, otosclerosis and progressive hearing loss.^{10,11} It is possible that a hidden immunological reaction may be the cause of these diseases.^{7,12,13}

The internal ear was thought to be segregated from the immune system, since it was considered to be isolated inside the temporal bone without lymphatic drainage.¹⁴ Research carried out in the past 30 years has changed this notion. A recent study by Yimtae et al. has found evidence of IE drainage through the middle ear to cervical lymph nodes. There is also evidence of drainage from the endolymphatic sac (ES) to local lymph nodes.¹⁵

Some investigators suggest that part of the cases of MD previously classified as idiopathic are caused by immune factors.^{8,12,16-18} The difficulty to establish MD as an

unequivocal immunomediated disease results from the impossibility of collecting cochlear tissue samples.

The clinical course of MD, including hearing fluctuations, asymptomatic periods and oscillation in the severity of illness, with slow and progressive deterioration of the affected organ, is similar to that observed in several autoimmune diseases. These are exacerbated by physical and psychological stress, an observation that is also valid for MD.^{19,20}

The HSP (heat shock protein) is a molecular chaperone, which is produced by pathogens and hosts that rapidly increase its concentration in response to the cell's exposure to environmental stresses. It takes place in bacteria and in human beings (36, 5). There are controversies regarding the functions of these proteins. Data suggest that HSP aids the recovery of protein's conformity. HSP causes a dilemma to the host's immune system, which has to recognize the sequence of the HSP of pathogenic organisms while simultaneously halts the incitement of immune reaction to its own tissue's HSP.

The purposes of the present study were 1) to determine if there is a relationship between the presence of anti-HSP70 antibody and the clinical characteristics of MD, 2) if this relationship varies along the course of the disease and 3) if the presence of anti-HSP70 is useful to distinguish a subgroup of MD patients. For that, patients with MD were compared with a control group of patients with non-Ménière inner ear disorders (IED).

PATIENTS AND METHODS

We conducted a prospective case-control study²¹ to evaluate the frequency of anti-HSP70 antibodies with ELISA and Western blot (WB). The study group included individuals with a diagnosis of MD patients (American Academy of Otorhinolaryngology

and Head Neck Surgery criteria),^{2,22} and the control group included patients with non-Ménière IED.

The individuals in the study group were selected from an existing registry at the Otorhinolaryngology Service outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The patients were invited to participate by regular mail. They were informed as to the objectives of the study and were reassured that the unwillingness to participate would not affect their status as patients in the clinic. Fifteen patients did not show up for the medical evaluation in response to the invitation letter. Among the remaining 49, 18 were excluded because they did not meet the standardized criteria for MD. Thus, 31 patients were included the study group.

The control group encompassed 81 patients with non-Ménière IED who were seen at the otology clinic. Three diabetic patients were excluded and 78 patients were included in the control group. The study was conducted with the evaluation of 109 patients. Both groups underwent anamnesis, otolaryngological examination, otoneurological examination, etiological research, autoantibody research with ELISA and WB and imaging test in instances of unilateral hearing loss. The glycerol test was conducted in the study group only. The clinical data were analyzed based on a questionnaire specifically developed for the study to evaluate patients with MD (Appendix 1).

Blood samples (5 ml) were collected from all patients in both groups after they signed an informed consent form (Appendix 2).

Clinical history

Patients the study group had were diagnosed with MD according to the following criteria^{2,23}:

- 1) Floating or progressive SNHL demonstrated by serial audiometry and/or by a positive glycerol test. The parameter used to evaluate hearing thresholds was the average of 4 pure tones (500 Hz, 1 kHz, 2 kHz, 3 kHz).
- 2) Vertigo typical of MD, associated with unsteadiness lasting between 20 minutes and 24 hours (at least two episodes). The patient is oriented and conscious and there are no neurologic sequelae.
- 3) Unilateral or bilateral tinnitus.

Patients with a history of treatment with immunosuppressor drugs or anti-inflammatory corticosteroids within the last three months, burns, diabetes mellitus, Alzheimer disease, ulcerative colitis, cancer, fever or recent infection by influenza, were excluded from the study, since these conditions affect the levels of HSP70.²⁴ In the study group, patients presenting evidence of compromise of the central nervous system, such as tumor affecting the VIII cranial nerve and evidence of other clinical entities that could mimic the clinical symptoms of MD (Ménière-like diseases) were excluded. In addition to sex and age, clinical symptoms such as type of vertigo, hearing loss, presence of aural fullness, tinnitus, family history of MD, duration of the disease, laterality and activity of the disease were evaluated.

The time elapsed since the most recent vertigo episode or hearing fluctuation was evaluated and the disease was considered to be active in the presence of at least one vertigo or hearing fluctuation episode within the 30 day period prior to the drawing of blood samples.²⁵ Disease duration was defined based on the onset of the symptoms in patients who fulfilled the criteria for the MD.^{2,23}

Radiological examinations

Imaging examinations, such as computed tomography (CT) with contrast and, if necessary, magnetic resonance imaging (MRI) were performed to rule out lesions on the

VIII cranial nerve in patients with unilateral SNHL or involvement of the central nervous system and also in those with brain stem auditory evoked response audiometry (ABR) or clinical signs suggesting retrocochlear involvement.

Otolaryngological examination

The otolaryngological examination consisted of a review of the clinical history to detect the previous or current presence of relevant clinical manifestations. A standard protocol was used for all patients, encompassing a general otolaryngological examination and audiologic and otoneurological assessment (Appendix 1).

The clinical examination was characterized by inspection and palpation of the head and neck, otoscopy, anterior rhinoscopy, oroscopy and acumetry.

Audiological examination

The audiologic characteristics were established based on conventional tone and vocal audiometry with determination of the air and bone conduction thresholds using an acoustic cabin and an AD 17 model audiometer (Interacoustics). Immitance audiometry was also conducted, including tympanometry, stapedial reflex and static compliance, using an AZ 26 immitance audiometer (Interacoustics).

The patients in the study group underwent a glycerol test, defined as positive in the presence of a 10 dB improvement in three frequencies (500, 1000 e 2000 Hz).

Otoneurological examination

Normality was determined through examination of cranial nerves and electronystagmography.

The examination of cranial nerves was performed as described by Ganança and Mangabeira Albernaz,²⁵ with research of nerve II for visual acuity, symmetry and reaction; nerves III, IV and V for ocular motility, size, and pupillary reaction; V for corneal reflex, face and nasal mucosa sensibility; VII for facial motility; IX for motility and sensibility of

the palate; X for motility of the palate; XI for movements of the sternocleidomastoid and trapezium muscles; and XII for inspection and motility of the tongue.

Electronystagmography was conducted with a Neuro Otometrie Hortmann apparatus, following the methodology of Ganança et al.²⁶

Etiologic research

The following laboratory tests were performed: serology for syphilis; unspecific test to verify inflammatory activity (erythrocyte sedimentation rate, ESR); evaluation tests for coexisting systemic immunological diseases via anti-nuclear factor (FAN), rheumatoid factor (RF) and serum complement titers (C3 and C4); lipid profile (total cholesterol and fractions, triglycerides), fasting (10 to 16 hours) 5-hour glucose and insulin curves with 100 g glucose load. The following times were evaluated:

- glucose concentration: 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 minutes.
- insulin concentration was evaluated at the same times, using a radioimmunoassay and classified according to the criteria of Kraft.²⁷

Autoantibody research

Anti-HSP70 was measured using ELISA and WB.²⁸ The analysis was double-blind: serum was tested without knowledge concerning the group to which the samples belonged, while clinical management was based on the clinical diagnosis, without knowledge of lab test results. Laboratory testing was conducted at the Biomedical Research Institute's Immunorheumatology Laboratory at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Patients were evaluated regarding age, time since the onset of symptoms, presence of unilateral or bilateral disease and disease activity in association with the results obtained with ELISA and WB. The association between the presence of autoantibodies and MD

or IED was also verified. Data were entered into an Excel spreadsheet and analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 11.0.

Blood collection

Blood (5 ml) was drawn from each patient. 2 ml were placed in a nonheparinized serum tube for coagulation and to obtain serum; the remaining blood was transferred to heparinized tubes. The remaining blood was diluted in RPMI (Sigma) medium and centrifuged over 1077 Histopaque (Sigma) for separation of circulating cells, which were frozen at -80 °C. The serum was initially kept at 4 °C for analysis of autoantibodies. Azida 0.01% was added to prevent the growth of microorganisms.

Production of human HSP70 and WB and ELISA were carried out as described by Munari et al.²⁸

Statistical analysis

The sample size was determined based on a pilot study using the formula of Cochran.²⁹ To verify the association between categorical variables, the chi-square and Fisher's exact tests were used, whenever appropriate. For the comparison of means of continuous variables, the Student's t test was used. The non-parametric Mann-Whitney test was used to analyze duration of disease (ordinal). The agreement between ELISA and WB was tested using McNemar's Kappa and the chi-square test. Significance was established as $p = 0.05$. The analyses were made using SPSS 11.0. Epi Info 6.04d was used for the calculation of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and 95% confidence intervals.

RESULTS

Characteristics of the study and control groups

Of the 31 patients in the study group, 12 were male (38.7%) and 19 were female (61.3%). Mean age was 39.5 years (SD±15.5 years), ranging from 12 to 75 years. The disease was bilateral in 13 patients (41.9%) (Table I).

The time elapsed between the onset of symptoms and the initial examination was between 1 and 6 months for one patient (3.2%) and 6 and 12 months for one patient (3.2%). For 29 patients (93.6%), the evaluation occurred 12 months after the onset of symptoms (Table II). Aural fullness was present in 14 patients (45.2%). Eight patients (25.8%) presented a family history suggestive of MD. As to disease's activity, 21.7% of patients did not present active disease.

Tinnitus was present in all patients with MD (100%); acute unilateral tinnitus was more common and was present in 17 patients (54.8%). The glycerol test was performed in all MD patients, with positive results in 15 (48.4%). Labyrinth hypoactivity was the most common finding on electronystagmography, observed in 20 (64.51%) patients; meanwhile five (16.12%) had a normal examination, three (9.67%) were unable to undergo the examination, two (6.45%) presented mixed vestibular impairment and one (3.22%) presented labyrinth hyperreflexia.

Of the 78 control patients, 47 were male (60.3%) and 31 female (39.7%). Mean age was 46.1 years (SD ± 15.9 years), ranging from 7 to 80 years of age. The disease was bilateral in 50 patients (64.1%) (Table I). The time elapsed between the onset of symptoms and the initial examination was 30 days or less in four patients (5.1%), between 1 and 6 months in 12 (15.4%) patients, between 6 and 12 months in 8 patients (10.3%) and more than one year in 54 patients (69.2%) (Table II). Tinnitus was observed in 61 patients (78.2%) with non-Ménière IED; acute unilateral tinnitus was more common, affecting 43

(55.1%) patients. Aural fullness was present in 15 patients (19.2%). Four patients (5.1%) had a family history of hearing loss. As to disease's activity, 73,1% of patients did not present active disease.

All patients in the MD group had experienced typical vertigo symptoms at least once since the appearance of clinical MD signs. At the time of the study, 27 MD patients (87.1%) reported typical vertigo and four (12.9%) reported non-rotational dizziness. In the control group, 41 patients (52.6%) had never experienced vestibular complaints, but 10 (12.8%) patients reported symptoms of typical vertigo, even though they did not fulfill criteria for MD. Twenty-seven patients (34.6%) patients reported non-rotational dizziness.

Concerning hearing loss, fifteen MD patients (48.4%) presented fluctuating and progressive SNHL and seven (22.6%) patients reported progressive fluctuating bilateral hearing loss. In the remaining patients hearing fluctuation was not observed, but unilateral progressive SNHL was observed in two (6.5%) patients, and progressive bilateral SNHL was observed in six (19.3%) patients. One patient (3.2%) presented mixed hearing loss due to MD associated with otosclerosis. In the control group, four patients (5.1%) presented fluctuating progressive unilateral SNHL and five (6.4%) patients presented fluctuating and progressive bilateral SNHL. In the remaining patients hearing fluctuation was not observed, however SNHL was observed in five (6.4%) patients, bilateral progressive hearing loss in seven (9%) and stable SNHL in forty five patients (57.7%). Twelve patients (15.4%) presented mixed hearing loss with a diagnosis of otosclerosis (Table III).

Three patients (9.7%) of the MD group were given intratympanic gentamicyn, with control of symptoms. All presented positive anti-HSP70 on both ELISA and WB. Four patients (5.1%) in the non-MD IED group and one patient (3.2%) in the MD group presented positive test results for syphilis, however tests results did not confirm active disease in these patients.

Four study group patients presented autoimmune disease, three of them presented Hashimoto's disease (chronic thyroiditis) and 1 of them presented rheumatoid arthritis in remission.

One patient in the control group with a negative anti-HSP70 test on both methods had an abnormal imaging examination and was diagnosed with vestibular schwannoma. Several diagnostic hypotheses were proposed for the 78 patients in the control group (Table IV).

Etiologic investigation in MD patients

The patients in the MD group were examined to investigate the possibility that MD was caused by changes in carbohydrate metabolism. The glyceimic and insulin curves were analyzed in 30 patients (96.8%) five hours after the administration of 100 g of glucose. One (3.2%) was unable to complete the examination. Nine patients (30%) presented normal glyceimic curves, six (20%) patients presented hyperglycemia, and fifteen (50%) presented hypoglycemia. Insulin curves were normal in eight (26.6%) patients and abnormal in twenty two (73.4%). Three (10%) patients presented a type II 1 curve; twelve (40%) patients presented a type II 2 curve, two (6.7%) type III b and five (16.7%) patients presented a type IV curve. No type V curve was found, considering the classification of Kraft,²⁷ however, three patients (10%) presented a flat glyceimic curve.

The remaining etiologic results were as follows: three (9,7%) patients presented serologic alterations suggesting hypothyroidism and eleven (35,5%) presented increased LDL cholesterol. None of the hypothyroidism patients were anti-HSP70 positive. However, two patients with increased LDL cholesterol were anti-HSP70 positive on WB, one of them with a positive ELISA result as well.

The diagnostic hypotheses for the patients in the study group were: metabolic etiology in twenty four patients, otosclerosis in one, otitis media in three, and combined

chronic otitis media and carbohydrate metabolism disorder in two patients. The etiology was not defined for five patients (Table V). Patients with a diagnosis of chronic otitis media did not present either suppuration or infection of the middle ear for over three months. Among patients with idiopathic etiology, and none presented positive serology for HSP70.

Correlation between etiologic findings and the method of autoantibodies research

The five MD patients with undefined etiology had a negative serology with both WB and ELISA. Altered carbohydrate metabolism was the etiological factor in the four patients who presented positive results with ELISA; all had unilateral MD. Em relação ao WB, nos oito pacientes com o teste positivo, a etiologia foi dismetabolopatia dos carboidratos com curvas tipo II ou III, mas uma paciente tinha história de artrite reumatóide e pseudogota, no passado, e estava sem tratamento há 6 meses. Entre os oito pacientes, cinco tiveram DM unilateral e três DM bilateral. Dois pacientes apresentavam mais de uma etiologia (dismetabolopatia dos carboidratos e otite média crônica). Estes últimos tiveram doença bilateral.

Regarding WB, the etiology for all eight patients with positive tests results was carbohydrate metabolism disorder with curves type II or III curves. Still, one patient had a history of rheumatoid arthritis and pseudogout, which had been untreated for six months. Among the eight patients, five presented unilateral MD and three presented bilateral disease. Two patients presented more than one etiology: carbohydrate metabolism disorder and chronic otitis media.

Immunologic tests

Unspecific immunity tests

ESR, FAN, FR and C4 tests did not reveal any alteration, except in one (3.2%) patient, who presented history of rheumatoid arthritis and pseudogout that has been

untreated for six months, with an elevated C3 dosage. All other lab test results were within the normal range. In the control group, 10 (14.1%) patients presented a high sedimentation rate (ESR); however, tests' results (FAN, FR, C3 e C4) were normal.

Autoantibody research

Positive ELISA results were observed in 27 (87.1%) MD patients. In the control group, 19 (24, 4%) patients had a positive ELISA vs. 59 (75.6%) patients with negative results.

WB was positive in eight (25, 8%) patients with MD and negative in 23 (74.2%) patients. Meanwhile, in the control group, 14 (17.9%) patients presented positive results and 64 (82.1%) patients presented negative results.

In the MD group, ELISA was positive in four (12.9%) patients and WB was positive in eight (25.8%) patients. One patient with positive ELISA presented active disease, while three patients with positive results presented inactive disease. As to WB, two patients presented positive results and active disease, while another six patients with positive WB did not present active disease.

Regarding laterality in relation to anti-HSP70 all MD patients with positive ELISA results presented unilateral disease. Of eight patients with positive WB three presented bilateral disease. Three patients (9.7%) who presented positive results for both tests had metabolic MD and were submitted to intra-tympanic gentamicin. Twenty two patients (71%) presented negative results for both tests.

There was a low agreement between the ELISA and the WB (Kappa coefficient: 0,396).

Correlation between unspecific immunity tests and ELISA or WB

The four patients in the study group with positive results on ELISA, and the eight patients with positive WB did not present alterations in inflammatory activity.

In the control group, 10 patients presented altered ESR. Of these, one patient presented otosclerosis, three presented bilateral SNHL of unknown etiology and six patients presented sudden deafness. Five presented positive results in one or both anti-HSP70 research methods. Anti-HSP70 via ELISA was positive in three patients, two of them receiving a diagnosis of sudden deafness. One patient was diagnosed with bilateral SNHL of unknown etiology. Concerning WB, four patients were anti-HSP70 positive: two had a diagnosis of sudden deafness, one had a diagnosis of otosclerosis and one had a diagnosis of bilateral SNHL of unknown etiology. Two (20%) patients with sudden deafness presented positive ELISA and WB.

Prevalence of anti-HSP70 in MD and IED

The prevalence of anti-HSP70 according to WB was 25.8% in patients with MD and 17.9% in the control group. ELISA revealed a prevalence of 12.9% in patients with MD and of 24.4% in the control group.

Sensitivity and specificity of HSP70 (WB and ELISA) to establish autoimmune disease in MD and IED

In patients with MD, we considered the clinical diagnosis as the gold standard. Based on that, we compared the results obtained with ELISA and WB. A 95% confidence interval (95% CI) was used with both methods.

The ELISA method had a sensitivity of 12.9% (95%CI 4.2; 30.8), a specificity of 75.6% (95%CI 64.4; 84.3), a positive predictive value of 17.4% (95%CI 5.7; 39.5) and a negative predictive value of 68.6% (95%CI 57.6; 77.9%) (Table VII).

The WB method had a sensitivity of 25.8% (95%CI 12.5; 44.9), specificity of 82.1% (95%CI 71.4; 89.5), positive predictive value of 36.4% (95%CI 18.0; 59.2) and negative predictive value of 73.6% (95%CI 62.8; 82.2%) (Table VIII).

DISCUSSION

Characteristics of the study and control groups

Soliman has suggested that in studies evaluating the validity of autoimmunity tests for the IE, patients with otological pathologies would be a more appropriate control group than healthy individual, especially patients with idiopathic hearing loss not suggestive of immunomediated etiology³⁰. Patients with other known autoimmune diseases and healthy patients could also be included to evaluate diagnosis specificity⁴⁷.

Regarding the clinical characteristics of the groups evaluated, we did not observe a statistical association between positive results for anti-HSP70 and younger age, as Garcia previously described by Garcia Berrocal et al.³¹

In the control group, bilateral hearing loss was predominant, differently from the study group, in which unilateral disease was more frequent. There was significant difference in terms of laterality among groups. It is believed that bilateral disease is more often associated with systemic processes. Thus, one could expect that the presence of autoantibodies be more prevalent in the bilateral disease, as discussed below. In the study group, floating progressive hearing loss was present in 22 (71%) patients, in accordance with data from in the literature.¹⁸ One patient with mixed hearing loss was diagnosed with otosclerosis, a potential cause for MD.

Vestibular hyporeflexia was the most frequent finding on electronystagmography, as previously described. Data regarding aural fullness, presence of tinnitus and vertigo were similar to those previously reported.¹⁸

Among the patients evaluated in our study, 83 (76.1%) were investigated more than one year after the onset of symptoms. This may have influenced anti-HSP70 titers.

The presence of anti-HSP70 was identified by both methods in all three (9.7%) patients receiving intratympanic gentamicyn. The rise of anti-HSP70 antibodies may be a result of cellular death caused by the treatment.

Patients with positive results for syphilis did not present the same result upon repetition of the test, nor they presented history of active disease, as well as none of them presented positive FTA-Abs. Thus, vestibulocochlear symptoms could not be attributed to this possible causal factor.

Etiologic investigation in the study group

Patients with type II and III insulin curves have a high probability of becoming diabetic. The nine patients who were positive for HSP70 with one or both methods had type II and III insulin curves; in two these curves were associated with hypoglycemia. A type IV insulin curve with fasting value higher than 50 U/l is suggestive of diabetes mellitus. Even though none of the patients presented a type V curve, three patients had a flat glycemc curve, which frequently is associated with glucose malabsorption disorders (disaccharidase malabsorption) arising from enzymatic deficiency, the most common of which is lactase deficiency. Those patients were referred for a lactose tolerance test, but only one patient underwent the test and had the diagnosis confirmed. The most prevalent etiology in patients with MD was altered carbohydrate metabolism, in accordance with previous studies.³²⁻³⁴

Correlation of etiology findings with ELISA and WB

The autoantibody detection tests were conducted using the ELISA and WB methods. Such tests are known as specific immune tests; however, anti-HSP70 is not specific for the IE.

The MD five (16.1%) patients with idiopathic etiology had negative serology with both WB and ELISA, an unexpected finding. The etiology was identified in all patients with positive serology. Statistical analysis did not reveal an association between MD and known etiology or presence of autoantibodies (Tables VI and VII), possibly due to the small size of the sample.

The two MD patients with two etiologic factors (chronic otitis media and altered carbohydrate metabolism) had a positive WB result and bilateral disease. A theory known as “sympathetic cochleolabyrinthitis” provides a possible explanation for delayed hearing loss in an only-hearing ear. We believe that bilateral disease in patients with chronic unilateral disease of the middle ear may arise from antigen release during the period of hearing deterioration, generating an immune response and consequent disease in the contra-lateral ear following infection or surgery of the IE (for exposure of the antigens).³⁵

In the study group, the fact that none of the three patients with hypothyroidism presented positive anti-HSP70 is remarkable, since it is known that thyroid pathologies, such as Hashimoto's thyroiditis, are autoimmune diseases. Regarding the two patients with increased LDL cholesterol who presented anti-HSP70 identified by WB and/or ELISA, it is possible that anti-oxidated LDL antibodies (resulting from the cell aging process) are responsible for the formation of the atherosclerotic plaque and this process could explain the presence of anti-HSP70 in these patients.³⁶ However, it is not possible to associate the presence of autoantibodies with LDL as other patients with autoantibodies anti-HSP70 presented normal LDL cholesterol.

Immunologic tests

Unspecific immune tests

In our MD group a correlation between inflammatory activity and anti-HSP70 was not observed. In the control group, of 10 patients with ESR (erythrocyte sedimentation rate), five presented positive anti-HSP70 in the ELISA or the WB, three presented positive results in the ELISA, four presented positive results in the WB, and two presented positive results in both methods. However, statistical analyses did not establish an association between inflammatory activity and autoantibodies, as shown in Tables XI and XII. The unspecific immune tests did not detect instances of autoimmune disease.

Even though laboratory tests may be useful in the investigation of immunomediated IED, the diagnosis is still based upon the improvement of symptoms in response to corticosteroid treatment, which is considered to be the gold standard in this situation.³⁷ Hirose et al. evaluated the usefulness of laboratory tests in IED of probable immunomediated etiology.³⁵ In that study, the patients were observed two weeks after the onset of otological and vestibular symptoms. The authors suggest ESR as the best test for the diagnosis of patients with clinical manifestations of immunomediated IED, to detect the presence of acute inflammatory activity. In the presence of increased ESR, specific immune tests, such as FAN, FR, C3 and C4 may be required, and depending on the suspected diagnosis, other additional tests may be performed as well. Our study demonstrated that the above mentioned immunity tests are not required as part of the routine etiologic investigation in the absence of autoimmune symptoms, confirming the findings of Hirose et al.³⁵

Autoantibody research method

Hirose et al. state in addition to ESR, detection of anti-HSP70 with WB is useful to diagnose immunomediated IED.^{35,37} In the present series, we did not find an association

between the presence of autoantibodies (ELISA and WB), disease activity^{31,37} and bilateral disease.³⁸ There was no agreement between the ELISA and the WB in our study (coefficient of Kappa 0.396).

Concerning duration of disease vs. activity, the period of time elapsed between the onset of clinical manifestations and anti-HSP70 testing (ELISA and WB) was longer than one year for 83 patients (76.1%). Seventy-eight patients (71.6%) presented inactive disease. Comparing the study group with the control group regarding disease duration and activity, no statistical differences were observed with either WB or ELISA. The long disease duration and the fact that most patients did not present active disease could explain the low rates of detected autoantibodies.

Garcia Berrocal et al. conducted a study to evaluate the validity of HSP70 detected by WB in MD, sudden deafness and progressive hearing loss. The mean time elapsed between the onset of hearing loss and the patients' initial examination was of 32.6 months for the group with idiopathic progressive DNS and 44.2 months for MD patients. The study attempted to link the presence of autoantibodies to the activity of the disease, supposing that the presence of HSP70 is a phenomenon derived from the tissue destruction time. If the heat shock protein is released in early stages of cellular damage, it will not be detected in advanced stages of the disease. The long interval between the onset of symptoms and medical attention may block anti-HSP70 autoantibodies, decreasing the effectiveness of this analysis, even in instances of active disease, leading to negative results. Such a finding would prove the importance of HSP70 for an early local immune response arising from tissular aggression to the IE.³¹

Garcia Berrocal has argued, in another study, that IED most probably is a result of an immune cell response, as observed in experimental studies, with recruitment of

inflammatory cells near the cochlea, fact that associated to the sudden clinical presentation may not allow the formation of anti-HSP70 antibodies.¹⁴

Mosciki has established the clinical criteria for progressive immunomediated IED associated with the presence of autoantibodies anti-HSP70 and positive response to corticosteroids. He found positive results in 89% of the patients with active disease in the three months prior to testing, compared to no positive result in the 25 patients with inactive disease within the same time frame.³⁷

Laterality

The presence of progressive bilateral SNHL could facilitate the production of anti-HSP70 autoantibodies, as the damage could affect both ears for a longer period of time (for weeks or months), differently from what occurs in sudden deafness, in which hearing loss occurs within hours or days. The most extensive damage of the bilateral lesion would facilitate the production of anti-HSP70 autoantibodies during active disease. However, these findings were not confirmed.³⁸

There is a discussion regarding the symptoms that are shared by progressive bilateral SNHL and MD and the fact that it is not always possible to differentiate these entities solely based on clinical manifestations, since a definitive diagnostic test is not available. Patients with SNHL with no etiologic indication should receive treatment with immune suppressors for a possible immunomediated etiopathogeny. Sudden deafness is a different disease, characterized by unilateral SNHL, which occurs within 72 hours, treated with corticosteroids since the pathological process may be either inflammatory or immunological. There are reports of patients with initially unilateral sudden deafness who later develop bilateral IED responsive to immune suppressor treatment.³⁹

Some authors believe that the majority of cases of MD have an associated autoimmune disease, while others suggest that the rapidly progressing idiopathic bilateral

SNHL is a separate entity that may be differentiated from MD as it presents rapidly progressive bilateral involvement, predominance of hearing loss over vestibular symptoms, and response to corticosteroids associated with the presence of HSP70 autoantibodies.^{16,40} Rahman et al. observed that many patients who responded to immune suppressor therapy initially presented unilateral disease. Bilateral MD is not uncommon and may respond to corticosteroids and immune suppressors.^{16,41} The clinical characteristics of patients with MD are compatible with an immunomediated condition involving both ears in 30 to 60% of patients who were followed up for extended periods of time.⁴²

Natural history of the disease

Some factors should be underscored regarding the course of the disease. Some patients experience remission of symptoms with anti-inflammatory treatment; thus, not all patients responding to corticosteroids have immunomediated disease, as in the initial stages of otosyphilis. Another confounding factor is the assumed control of symptoms in patients who spontaneously improve regardless of treatment. Hirose et al. suggested that the response to corticosteroids should be considered as positive if it is necessary to maintain treatment for extended periods of time to avoid progression of the IED.³⁵ An example of this is that the symptoms of about 10% of the patients with MD improve with the use of corticosteroids.³⁹

WB vs. ELISA

Some issues concerning anti-HSP70 detection with WB should be discussed. First, the test was positive in some of the patients when a whole cell lysate was used, and negative with purified antigen. The second relevant issue was that if large quantities of purified HSP70 were used, both the patients and controls would have positive results.

The major issue concerning the use of WB to screen for IED is that it generally uses a whole cell lysate, potentially leading to false positive results, since in addition to HSP70

it also identifies other 70 kD proteins. In the study we published in 2003, we verified that the amount of HSP70 present is crucial for WB and that high amounts of HSP70, even in normal patients may lead to a positive test. In this study we have used recombinant protein⁴³. Low levels of anti-HSP70 are found in all individuals. Another issue is the denaturation of the protein, which affects the recognition by the patient's serum.³⁰

A third, more delicate issue, is the antigen's lack of purity associated with the fact that the serum of both patients and controls present antibodies reactive to other antigen present in the raw extract, such as bovine albumin, which has a molecular weight slightly lower than 68 kDa, frequently distorting this region of the blot.²⁸ The solution for the issue of antigen impurity would be the performance of tests with recombinant protein.⁴³ The results of previous studies suggest that WB is not a suitable method to identify HSP70 autoantibodies, and that ELISA is a more reliable alternative for diagnosis.²⁸

ELISA³⁰ is a semi-quantitative technique and therefore more appropriate to identify positive and negative results. The human IE protein has demonstrated more sensitivity in the pilot study conducted with patients with progressive SNHL, requiring lower concentration of antigens, thus minimizing false positive results.²⁸

Some autoimmune diseases are associated with autoantibodies that are not specific for organs and tissues, and consequently it may be more difficult to establish the significance of the presence of autoantibodies to identify etiology of the disease. A study by Shin et al. revealed a higher prevalence of anti-HSP70 in the serum of patients with MD than in controls, even though this autoantibody is not specific to the IE.⁴⁴ The doubt regarding the function of autoantibodies remains. We do not know if IED is a manifestation of the immune response against the increased production of HSP70 or if the antibodies could be an epi-phenomenon of the disease that may be associated with other

causal factors such as prior surgery or viral infection, the HSP70 not necessarily being related to the etiology of the disease.^{41,44,45}

Investigation of the HSP70 in MD and IED

Prevalence in MD and IED

WB revealed a higher prevalence of HSP70 in the group with MD (25.8%) as compared to the ELISA (12.9%), although without statistical significance. Thus, neither test was clinically useful in MD.

Sensitivity and specificity of the HSP70 (WB and ELISA) to identify auto-immune disease in MD and IED

In a study published by Harris et al. the detection of anti-HSP70 with WB presented a sensitivity of 42%, a specificity of 90% and positive predictive value of 91% for patients with positive response to corticoids, that is, patients who fulfilled the criteria for immunomediated IED and responded to immune suppressor treatment. However, according to those authors, patients with negative WB results may also benefit from corticoids, considering the test's low sensitivity. However, the patients in that study were treated less than two weeks after the onset of symptoms, in the presence of active disease.¹¹ Atlas et al. have also reported that the presence of these antibodies was significantly related to the active disease.⁴⁰

Munari et al. evaluated the results of ELISA in 13 patients with immunomediated SNHL and in 30 controls. They report a sensitivity of 84%, specificity of 93%, positive predictive value of 84% and negative predictive value of 92.8%. These results indicate a better diagnostic value in comparison to WB.²⁸

Rahman et al. report that about one third of the patients with MD presented anti-HSP-70 autoantibodies, an observations that was also reported by others.¹⁶ Rauch et al. have also found an association between anti-HSP70 and MD.²⁴

In our case series, in the study group, the sensitivity and positive predictive value of the tests were low, while the specificity and negative predictive value were high. These characteristics would be useful in a diagnostic test for the confirmation of diagnosis. However, our results do not support this statement, since we did not find any significant difference between DM and IED and between methods (Tables VII and VIII).

Considerations on the origin of proteins for the test

The immunologic study of IED requires the purified IE antigen be readily accessible. IE proteins have been extracted from humans and mammals and used in clinical and experimental studies.⁴⁶ The detection of anti-HSP70 is clinically useful according to some studies; however, it may be difficult and time consuming to obtain the antigen for the test.⁴⁴ The collection of human IE tissue is usually conducted during translabyrinth surgeries of vestibular schwannoma. However, the amount is limited and the collection procedure is difficult. Thus, it is reasonable to use other mammal IE tissue instead of human tissue. Tissue from guinea pigs is abundant and can be completely removed by surgical dissection.⁴⁶ On the other hand, the small amount of tissue that can be obtained from guinea pigs increases cost. This difficulty in securing the antigen may be resolved if the observations of Yamanobe and Harris are followed³⁹. They argue that the 68 kDa antigen is ubiquitous and thus more accessible and abundant in other sites, such as the brain or kidney, which could be sources of antigen.⁴⁴ A previous study showed that antigen obtained from temporal bones of human cadavers and bovine temporal bones displayed similar bands for SDS-PAGE analysis.³⁹

Cao et al. stated that in many studies protein is extracted from whole IE tissue, whereas it would be better to fraction the proteins as each component of the IE has a specific histology and physiologic function and may have different antigenicity. It would be important to identify in which components of the IE the antigenic epitopes are located

and which interactions between antigens and antibodies may be relevant for the pathogenesis of immunomediated IED. Those authors argue that it would be convenient to purify the different antigens for each portion of the IE and to study each the sequence of amino acids.⁴⁶

Even though Moscicki et al. have found an association between the 68 kD protein and immunomediated IED,³⁷ Cao et al. only observed reactivity in the bands from 42 to 58 kD.⁴⁶ These were mainly identified in the spiral ligament and stria vascularis, however, the 42 kD band did not react with the IED serum samples. The 30 kD band was found in Corti's organ, spiral ganglion, and acoustic nerve fibers, and reacted with the serum of patients with several IED.⁴⁶ Yamanobe and Harris demonstrated that the serum of patients with idiopathic SNHL reacted with 47, 50, 55, 62, and 68 kD proteins in all bovine tissues that were studied (not organ specific), with organ specific 58, 60 and 220 kD proteins in the IE and kidney, and with 32 and 33 to 35 kD protein in components of the IE.³⁹ The discrepancies between estimated molecular weight of the protein bands in the study by Yamanobe and Harris in relation to the study by Cao et al., may be due to the fact that they employed different animal models (bovine animals and guinea-pigs) and different extraction techniques or standard protein.⁴⁶ The articles mentioned by the authors reinforce the notion that the identification of these antibodies may represent an epiphenomenon and that is not related to the etiology of the hearing loss.^{39, 46}

Certainly the long period of time elapsed from the onset of symptoms and the research of autoantibodies may decrease the reactivity of the tests. In addition, five patients with MD of undefined etiology presented negative results for the ELISA and WB tests. The statistical analyses comparing the study group and the control group did not establish any association between age, sex, clinical characteristics of MD and serologic findings of

anti-HSP70 with ELISA and WB, suggesting that these methods are not clinically useful for the diagnosis of MD.

The prognostic and therapeutic value of anti-HSP70 autoantibodies in IED, including MD, has not been established. Prospective studies including a larger number of patients and subgroups of MD are required to determine if the different subgroups result from different pathogenic mechanisms and to identify the role of the immune response in this process. We believe a better understanding of the pathophysiology of immunomediated IED will allow the development of reliable laboratory tests and precise diagnostic and inclusion criteria.

CONCLUSIONS

- The detection of auto-antibodies via ELISA or the WB did not take place at a higher frequency in the group of patients with MD than in the group of patients with IED.

REFERENCES

1. Atkinson M. Ménière's original papers. Reprinted with an English translation together with commentaries and biographical sketch. *Acta Otolaryngol [Suppl]* (Stockh). 1961; 162.
2. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113(3):181-5.
3. Hughes GB. Ménière's disease. *Hearing Health.* 2001;17:2.
4. Cahali S, Cahali MB, Lavinsky L, Cahali RB. Hidropsia endolinfática. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 479-85.
5. Merchant SN, Rauch SD, Nadol JB Jr. Ménière's disease. *Eur Arch Othorhinolaryngol.* 1995;252(2):63-75.
6. Ruckenstein MJ. Immunologic aspects of Ménière's disease. *Am J Otolaryngol.* 1999;20(3):161-5.
7. Stone JH, Francis HW. Immune-mediated inner ear disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(1):32-40.
8. Paparella MM, Djalilian HR. Etiology, pathophysiology of symptoms and pathogenesis of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 2002;35(3):529-45.
9. Mouadeb DA, Ruckenstein M. Antiphospholipid inner ear syndrome. *Laryngoscope.* 2005;115(5):879-83.
10. Oliveira do Valle L, Almeida CI, Alves FR, Breuel ML. Perda Auditiva Progressiva. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 346-66.

11. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*. 1990;100(5):516-24.
12. Nina LG, Lourenço EA. Doenças imunomediadas da orelha interna. *Tratado de Otorrinolaringologia da Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia*. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2003. p. 140-47.
13. Proctor CA, Proctor TB, Proctor B. Etiology and treatment of fluid retention (hydrops) in Ménière syndrome. *Ear Nose Throat J*. 1992;71(12):631-5.
14. Garcia Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Immune response and immunopathology of inner ear: um update. *J Laryngol Otol*. 2000;114(2):101-7.
15. Yimtae K, Song H, Billings P, Harris JP, Keithley EM. Connection between the inner ear and the lymphatic system. *Laryngoscope*. 2001;111(9):1631-35.
16. Rahman M, Poe D, Choi H. Autoimmune vestibulo-cochlear disorders. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13(3):184-9.
17. Paparella MM. The cause (multifactorial inheritance) and pathogenesis (endolymphatic malabsorption) of Meniere's disease and its symptoms (mechanical and chemical). *Acta Otolaryngol*. 1985;99(3-4):445-51.
18. da Costa SS, de Sousa LC, Piza MR. Meniere's disease: overview, epidemiology, and natural history. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002;35(3):455-95.
19. Ruckenstein MJ. Autoimmune ear disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;12(5):426-30.
20. Derebery MJ. The role of allergy in Ménière's disease. *Otolaryngol Clin N Am*. 1997;30(6):1007-15.
21. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. *Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999. p. 79-87.

22. Pearson BW, Brackmann DE. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for reporting treatment results in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1985;93(5):579-81.
23. Derebery MJ. Prevalence of heat shock protein in patients with Ménière's disease and allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;126(6):677-82.
24. Rauch SD, Zurakowski D, Bloch DB, Bloch K. Anti-heat shock protein 70 in Ménière's disease. *Laryngoscope.* 2000;110(9):1516-20.
25. Ganança MM, Mangabeira Albernaz PL. Da frequência nistágmica a prova calórica pendular decrescente, estudo eletroneistagmográfico em indivíduos normais. Cádiz, Anais do Simpósio Iberoamericano de Otoneurologia, 1976.
26. Ganança MM, Munhoz MSL, Caovilla HH, da Silva MLG. As etapas da Equilibrimetria. In: *Equilibrimetria clínica.* Vol 1. Rio de Janeiro: Atheneu; 1999. p. 41-96.
27. Kraft JR. Detection of diabetes mellitus in situ (occult diabetes). *Lab Med.* 1975;6:10-22.
28. Munari L, Charcat S, Rodrigues L, von Muhllen CA, Bau AR, Lavinsky L, Bonorino C. An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *J Immunol Methods.* 2003;283(1-2):155-61.
29. Cochran WG. *Sampling techniques.* New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1977.
30. Soliman AM. Immune-mediated inner ear disease. *Am J Otol.* 1992;13(6):575-79.
31. Garcia Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein-70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope.* 2002;112(2):304-9.
32. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin, and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.

33. Lavinky L, D'Ávila C. Tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos com repercussão otológica. In: Lavinky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 373-77.
34. Lavinky L, Lavinsky J, D'Ávila C. Tratamento das principais disacusias neurossensoriais de causa sistêmica. In: Lavinky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 415-25.
35. Hirose K, Wener MH, Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope*. 1999;109(11):1749-54.
36. Rubin W. Tratamento das doenças sistêmicas com repercussão otoneurológica. In: Lavinky L. Tratamento em Otologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 557-63.
37. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB Jr, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticoid treatment. *JAMA*. 1994;272(8):611-6.
38. Saeed SR, Birzgalis AR, Ramsden R. Ménière's disease. *Br J Hosp Med*. 1994;51(11):603-12.
39. Yamanobe S, Harris JP. Inner ear-specific autoantibodies. *Laryngoscope*. 1993;103(3):319-25.
40. Atlas MD, Chai F, Boscatto L. Meniere's disease: evidence of an immune process. *Am J Otol*. 1998;19(5):628-31.
41. Rahman M, Poe D, Choi H. Etanercept therapy for immune-mediated cocleovestibular disorders: preliminary results in a pilot study. *Otol Neurotol*. 2001;22(5):619-24.
42. Shea JJ. Autoimmune sensorineural hearing loss as aggravation factor in Ménière's: a preliminary report. *Adv Otorhinolaryngol*. 1983;30:254-7.

43. Mehlert A, Young DB. Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71kD antigen, a member of the 70kD heat-shock protein family. *Mol Microbiol.* 1989;3(2):125-30.
44. Shin SO, Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Comparison of anti-heat shock protein 70 and anti-68 kDa inner ear protein in the sera of patients with Ménière's disease. *Laryngoscope.* 1997;107(2):222-7.
45. Harris JP. Immunology of inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1984;193:147-62.
46. Cao MY, Deggouj N, Gersdorff M, Tomasi JP. Guinea pig inner ear antigens: extraction and application to the study of human autoimmune inner ear disease. *Laryngoscope.* 1996;106(2 Pt 1):207-12.
47. Dornhoffer JL, Arenberg IK. Immune Mechanisms in Meniere's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 1997;30(6):1017-26.

Table I. Patients according to group and laterality

Laterality	MD		IED		Total	
	n	%	n	%	n	%
Unilateral	18	58.1	28	35.9	46	42.2
Bilateral	13	41.9	50	64.1	63	57.8
Total	31	100.0	78	100.0	109	100.0

P (Chi-square) = 0.008

Table II. Patients according to group and duration of disease

Duration	MD		IED		Total	
	n	%	n	%	n	%
Up to 30 days	0	0.0	4	5.1	4	3.7
1 to 6 months	1	3.2	12	15.4	13	11.9
6 to 12 months	1	3.2	8	10.3	9	8.3
More than 1 year	29	93.6	54	69.2	83	76.1
Total	31	100.0	78	100.0	109	100.0

P (Mann-Whitney) = 0.007

Table III. Patients according to group and hearing loss

Hearing loss	MD		IED		Total	
	n	%	n	%	n	%
Fluctuating progressive unilateral	15	48.4	4	5.1	19	17.4
Fluctuating progressive bilateral	7	22.6	5	6.4	12	11.0
Progressive unilateral	2	6.5	5	6.4	7	6.4
Progressive bilateral	6	19.3	7	9.0	13	11.9
Stable	0	0.0	45	57.7	44	40.4
Mixed	1	3.2	12	15.4	14	12.9
Total	31	100.0	78	100.0	109	100.0

Table IV. Distribution of control patients according to diagnosis

Diagnosis	IED	
	n	%
Bilateral sensorineural hearing loss of		
unknown etiology	23	29.5
Sudden hearing loss	14	17.9
Presbycusis	11	14.1
Drug ototoxicity	2	2.6
Noise-induced hearing loss	1	1.3
Vestibular schwannoma	1	1.3
Stroke	2	2.6
Otosclerosis	12	15.4
Transient hydrops	2	2.6
Arnold Chiari malformation	1	1.3
Unilateral sensorineural hearing loss of		
unknown etiology	9	11.5
Total	78	100.0

Table V. Distribution of patients in the study group according to diagnosis

Type of MD	n
Metabolic	24
Idiopathic	5
Chronic otitis	3
Chronic otitis and metabolic changes	2
Otosclerosis	1

MD = Ménière's disease.

Table VI. Main results for individual patients

Group	Age	Sex	Laterality	Status	Duration		ELISA	WB	ESR ^a	Diagnosis ^b
					(months)					
MD	46	Male	unilateral	inactive	>12		positive	positive	1	Metabolic
MD	57	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Otosclerosis
MD	22	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	positive	1	COM/ Metabolic
MD	28	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	27	Fem	bilateral	active	>12		negative	positive	1	Metabolic
MD	28	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	38	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	57	Male	bilateral	active	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	12	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	27	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Idiopathic
MD	45	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	positive	1	COM/ Metabolic
MD	12	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	38	Male	unilateral	inactive	>12		positive	negative	1	Metabolic
MD	24	Fem	unilateral	active	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	32	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	63	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Idiopathic
MD	48	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	51	Male	unilateral	inactive	>12		negative	positive	1	Metabolic
MD	56	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	positive	1	Metabolic
MD	25	Male	unilateral	inactive	>12		positive	positive	1	Metabolic
MD	21	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	57	Fem	bilateral	active	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	44	Fem	bilateral	active	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	39	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Idiopathic
MD	30	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	37	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	43	Fem	bilateral	active	>12		negative	negative	1	Idiopathic
MD	40	Male	bilateral	active	>12		negative	negative	1	Metabolic
MD	40	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	COM
MD	63	Male	bilateral	active	1-6		negative	negative	1	Idiopathic
MD	75	Male	unilateral	active	6-12		positive	positive	1	Metabolic
IED	16	Male	unilateral	inactive	1-6		negative	negative	1	Unilateral SNHL

^a 1 = normal; 2 = altered.

^b SNHL = sensorineural hearing loss. Bilateral or unilateral SNHL indicate unknown etiology. COM = Chronic otitis media.

Table VI. Main results for individual patients

Group	Age	Sex	Laterality	Status	Duration		ELISA	WB	ESR ^a	Diagnosis ^b
					(months)					
IED	67	Male	unilateral	inactive	1-6		positive	negative	1	Sudden loss
IED	52	Fem	bilateral	inactive	6-12		negative	negative	1	Stroke
IED	30	Fem	bilateral	inactive	>12		positive	negative	1	DNS bilateral
IED	61	Male	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Ototoxicity
IED	51	Male	unilateral	inactive	>12		positive	negative	1	Unilateral SNHL
IED	28	Fem	unilateral	inactive	>12		positive	negative	1	Sudden loss
IED	80	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Sudden loss
IED	65	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Presbycusis
IED	65	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Presbycusis
IED	53	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Presbycusis
IED	41	Male	unilateral	inactive	>12		negative	positive	1	Unilateral SNHL
IED	38	Fem	unilateral	inactive	6-12		negative	negative	1	Unilateral SNHL
IED	54	Fem	bilateral	inactive	>12		negative	positive	2	Bilateral SNHL
IED	57	Fem	bilateral	inactive	6-12		positive	negative	1	Ototoxicity
IED	38	Male	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Otosclerosis
IED	55	Fem	bilateral	active	>12		positive	negative	1	Bilateral SNHL
IED	42	Male	bilateral	inactive	>12		positive	negative	2	Bilateral SNHL
IED	58	Male	bilateral	active	>12		negative	positive	2	Otosclerosis
IED	7	Male	bilateral	inactive	>12		positive	negative	1	Otosclerosis
IED	59	Fem	bilateral	inactive	1-6		negative	negative	1	Presbycusis
IED	40	Fem	bilateral	active	>12		negative	negative	2	Bilateral SNHL
IED	65	Male	bilateral	active	>12		positive	negative	1	Bilateral SNHL
IED	45	Male	unilateral	active	< 30 days		positive	positive	2	Sudden loss
IED	54	Male	unilateral	active	< 30 days		positive	positive	2	Sudden loss
IED	8	Fem	bilateral	active	>12		positive	negative	1	Bilateral SNHL
IED	63	Fem	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Neuroma
IED	45	Fem	bilateral	inactive	6-12		negative	negative	1	Bilateral SNHL
IED	60	Male	bilateral	inactive	1-6		negative	positive	1	Bilateral SNHL
IED	63	Male	bilateral	inactive	>12		negative	positive	1	Presbycusis
IED	35	Fem	bilateral	active	>12		negative	positive	1	Otosclerosis
IED	48	Male	bilateral	inactive	>12		negative	positive	1	Presbycusis
IED	77	Male	bilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Presbycusis

^a 1 = normal; 2 = altered.

^b SNHL = sensorineural hearing loss. Bilateral or unilateral SNHL indicate unknown etiology. COM = Chronic otitis media.

Table VI. Main results for individual patients

Group	Age	Sex	Laterality	Status	Duration			Diagnosis ^b
					(months)	ELISA	WB	
IED	43	Male	unilateral	inactive	1-6	positive	negative	1 Unilateral SNHL
IED	58	Male	bilateral	inactive	>12	negative	positive	1 Presbycusis
IED	63	Fem	bilateral	inactive	>12	negative	positive	1 Stroke
IED	50	Male	bilateral	inactive	1-6	negative	negative	1 Presbycusis
IED	9	Fem	unilateral	inactive	>12	positive	negative	1 Sudden loss
IED	59	Male	bilateral	active	>12	negative	negative	1 Otosclerosis
IED	60	Fem	bilateral	active	1-6	negative	negative	1 Otosclerosis
IED	30	Male	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Bilateral SNHL
IED	50	Fem	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Bilateral SNHL
IED	58	Fem	bilateral	active	1-6	positive	negative	1 Otosclerosis Noise-induced
IED	45	Fem	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 hearing loss
IED	40	Fem	bilateral	active	1-6	positive	negative	1 Bilateral SNHL
IED	28	Male	unilateral	active	>12	negative	negative	2 Sudden loss
IED	44	Male	bilateral	active	>12	negative	negative	1 Otosclerosis
IED	40	Male	unilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Sudden loss
IED	60	Fem	unilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Unilateral SNHL
IED	56	Male	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Presbycusis
IED	42	Male	unilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Unilateral SNHL
IED	34	Fem	unilateral	inactive	1-6	negative	negative	1 Transient hydrops
IED	46	Male	bilateral	inactive	6-12	negative	negative	1 Bilateral SNHL
IED	35	Male	bilateral	inactive	6-12	negative	negative	1 Bilateral SNHL
IED	60	Male	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Presbycusis
IED	30	Fem	bilateral	inactive	6-12	negative	negative	1 Otosclerosis
IED	45	Male	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Bilateral SNHL
IED	45	Male	bilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Bilateral SNHL
IED	15	Male	bilateral	inactive	>12	negative	positive	1 Bilateral SNHL
IED	63	Fem	unilateral	inactive	6-12	negative	negative	2 Sudden loss
IED	44	Male	unilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Unilateral SNHL
IED	26	Male	unilateral	active	6-12	negative	negative	2 Sudden loss
IED	69	Male	unilateral	inactive	>12	negative	negative	1 Unilateral SNHL
IED	37	Male	bilateral	active	>12	negative	negative	1 Otosclerosis

^a 1 = normal; 2 = altered.

^b SNHL = sensorineural hearing loss. Bilateral or unilateral SNHL indicate unknown etiology. COM = Chronic otitis media.

Table VI. Main results for individual patients

Group	Age	Sex	Laterality	Status	Duration		ELISA	WB	ESR ^a	Diagnosis ^b
					(months)					
IED	54	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Sudden loss
IED	35	Male	unilateral	inactive	>12		negative	negative	1	Sudden loss
IED	50	Male	unilateral	inactive	6-12		negative	negative	1	Arnold Chiari
IED	30	Fem	bilateral	active	6-12		negative	negative	1	Otosclerosis
IED	46	Male	unilateral	inactive	6-12		negative	negative	2	Sudden loss
IED	44	Fem	unilateral	inactive	< 30 days		negative	negative	1	Sudden loss
IED	52	Male	unilateral	active	6-12		negative	negative	1	Otosclerosis
IED	58	Male	bilateral	inactive	6-12		negative	negative	1	Bilateral SNHL
IED	15	Fem	bilateral	active	< 30 days		negative	negative	1	Bilateral SNHL
IED	40	Male	unilateral	inactive	6-12		negative	negative	1	Transient hydrops
IED	32	Male	bilateral	inactive	1-6		negative	negative	1	Bilateral SNHL
IED	26	Male	bilateral	active	6-12		positive	negative	1	Bilateral SNHL
IED	38	Fem	bilateral	inactive	1-6		positive	positive	1	Bilateral SNHL
IED	70	Fem	bilateral	active	1-6		positive	positive	1	Bilateral SNHL

^b SNHL = sensorineural hearing loss. Bilateral or unilateral SNHL indicate unknown etiology. COM = Chronic otitis media.

Table VII. Distribution of patients according to group and ELISA results

ELISA	MD		IED		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positive	4	12.9	19	24.4	23	21.1
Negative	27	87.1	59	75.6	86	78.9
Total	31	100.0	78	100.0	109	100.0

P (chi-square) = 0.186

Table VIII. Distribution of patients according to group and WB results

WB	MD		IED		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positive	8	25.8	14	17.9	22	20.2
Negative	23	74.2	64	82.1	87	79.8
Total	31	100.0	78	100.0	109	100.0

P (chi square) = 0.356

WB = Western blot.

Table IX. Distribution of patients according to diagnosis and ELISA results

Diagnosis	ELISA					
	Positive		Negative		Total	
	n	%	n	%	n	%
Idiopathic	0	0.0	5	18.5	5	16.1
Known cause	4	100.0	22	81.5	26	83.9
Total	4	100.0	27	100.0	31	100.0

P (Fisher's exact test) = 1.000

Table X. Distribution of patients according to diagnosis and WB results

Diagnosis	WB					
	Positive		Negative		Total	
	n	%	n	%	n	%
Idiopathic	0	0.0	5	21.7	5	16.1
Known cause	8	100.0	18	78.3	26	83.9
Total	8	100.0	23	100.0	31	100.0

P (Fisher's exact test) = 0.2912

Table XI. Distribution of patients in the control group according to ESR and ELISA results

ESR	ELISA					
	Positive		Negative		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Altered</i>	3	15.8	7	11.9	10	12.8
Normal	16	84.2	52	88.1	68	87.2
Total	19	100.0	59	100.0	78	100.0

P (Fisher's exact test) = 0.6986.

ESR = Erythrocyte sedimentation rate.

Escrever o que é alterado

Table XII. Distribution of patients in the control group according to ESR and WB results

ESR	WB					
	Positive		Negative		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Altered</i>	4	28.6	6	9.4	10	12.8
Normal	10	71.4	58	90.6	68	87.2
Total	14	100.0	64	100.0	78	100.0

P (Fisher's exact test) = 0.0734

ESR = Erythrocyte sedimentation rate.

Escrever o que....

5. ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de Investigação de Pacientes com Doença de Ménière

1. Nº prontuário:
2. Idade à época de início dos sintomas: anos/Tempo de evolução dos sintomas: anos
3. Sexo: () M () F
4. História familiar compatível com diagnóstico sindrômico de Ménière: () Sim () Não
5. Sintomas:
 - 5.1. VERTIGEM
 - 5.1.1. () Vertigem típica () Tontura não rotatória
 - 5.1.2. Número médio mensal de episódios vertiginosos típicos nos últimos 6 meses (Y):
 - 5.2. DISACUSIA
 - 5.2.1. () Neurosensorial flutuante e progressiva 5.2.3. () Mista
 - 5.2.1.1. () Unilateral () Bilateral
 - 5.2.2. () Neurosensorial progressiva
 - 5.2.2.2. () Unilateral () Bilateral
 - 5.3. ZUMBIDOS:
 - 2.3.1. () unilaterais () binaurais 2.3.2. () graves () agudos
- 5.4. SENSACÃO DE PLENITUDE AURAL () Sim () Não

6. Exames Complementares

6.1. Audiometria Tonal

DOENÇA UNILATERAL – LADO

Média dos LAMs de 500 a 3000 Hz:

1. Ouvido doente dB ⇒ Estádio: 1.() ≤ 25 dB 2.() 26-40 dB 3.() 41-70 dB 4.() > 70
2. Ouvido normal dB

Média dos LAMs de 250, 500 e 1000 Hz: dB

Média dos LAMs de 1000, 2000 e 3000 Hz: dB

DOENÇA BILATERAL

Média dos LAMs de 500 a 3000 Hz: dB ⇒ Estádio 1.() 2.() 3.() 4.()

6.2. Audiometria Vocal

DOENÇA UNILATERAL

Discriminação ouvido doente: %

DOENÇA BILATERAL

Discriminação média: %

6.3. ENG

- () hiporreflexia vestibular 1. () Unilateral (lado ...) 2. () Bilateral
- () achados centrais

6.4. TC contrastada de ouvido e mastóide

- Normal
 Alterada: mastóides hipoaeradas
 redução das dimensões do triângulo de Trautmann
 hipoaeração periaquedutal

6.5. Exames de busca etiológica

VSG normal alterado

FAN R NR

C3 normal alterado: ↑ ↓

C4 normal alterado: ↑ ↓

VDRL e FTA-Abs R NR

Colesterol Normal Limítrofe Hipercolesterolemia (Valor:)

TG Normal Aumentado (valor:)

Glicemia de jejum: mg %

TTG 75 g:

1. Intolerância à glicose :

1.1. Glicemia de jejum > 110 mg/dl (6,1 mmol/l) e < 126 mg/dl (7 mmol/l); ou

1.2. TTG com 75 g em 2 horas > 140 mg/dl (7,8 mmol/l) e < 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

2. DM:

1. Sintomas compatíveis com DM + glicemia casual > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) em mais de uma ocasião; ou
2. Glicemia de jejum > 126 mg/dl (7 mmol/l) em mais de uma ocasião; ou
3. TTG com 75 g com valor em 2 horas > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) em mais de uma ocasião.

Adaptado da *American Diabetes Association*, 1999.

Curva glicêmica de 5 horas:

Hiperglicemia Hipoglicemia em 1 ou mais pontos. Hora (s) em que ocorreu (eram) a (s) hipoglicemia (s):..... um ou mais valores glicêmicos < 55 mg/dl ou queda dos valores glicêmicos superior a **1 mg/dl/min**

Curva insulinêmica de 5 horas:

1. **Tipo I:** curva normal: Valor em jejum: 0 a 25 μ U/l; Pico entre 30 e 60 min (independente do valor do pico); Valor em 120 min \leq 50 μ U/l; Soma dos valores em 120 e 180 min \leq 60 μ U/l; Valores entre 240 e 300 min na faixa do jejum.

2. **Tipo II:** pico normal com retorno lento:

2.1. Tipo II₁: pico entre 30 e 60 min; soma dos valores em 120 e 180 min entre 60 a 100 μ U/l (limítrofe);

2.2. Tipo II₂: pico entre 30 e 60 min; soma dos valores em 120 e 180 minutos \geq 100 μ U/l.

3. **Tipo III**

3.1. Tipo III_A: pico em 120 minutos

3.2. Tipo III_B: pico em 180 minutos

4. **Tipo IV:** valor em jejum > 50 μ U/l

5. **Tipo V:** curva insulinopênica (resposta insulínica baixa): todos os valores insulinêmicos < 50 μ U/l.

PFT

- T4 () Normal () Alterado
 TSH () Normal () Alterado

Tratamentos Prévios

- () Dieta hipossódica
 () Dieta de Updegraff em caso de dismetabolopatia dos glicídios;
 () Dieta com restrição de gordura em pacientes com alteração do perfil dos TG ou colesterol

Uso de:

1. () BZD. Qual?
 Período?.....

2. () Fármaco que aumente a perfusão – pentoxifilina, ginkgo biloba 761, dipiridamol, AAS, piracetam, ticlopidina
 Período?.....

2. () Diurético – Qual? Período?
 Outros fármacos:

Resposta ao tratamento clínico:

- () Satisfatória
 () Insatisfatória, mas sintomas não limitantes
 () Insatisfatória, mas sintomas limitantes.

- () Classe A (Controle completo do quadro vertiginoso) – valor 0
 () Classe B (Controle substancial) – valor 1 a 40
 () Classe C (Controle limitado) – valor 41 a 80
 () Classe D (Controle insignificante) – valor 81 a 120
 () Classe E (Controle muito pobre) – valor > 120

*** Para cálculo do valor numérico: $(X/Y) \times 100$, onde X corresponde ao número médio mensal de episódios vertiginosos típicos no período de 18 a 24 meses da instituição do tratamento e Y corresponde ao número médio mensal desses episódios nos 6 meses que antecederam o tratamento.**

ANEXO 2**Termo de Consentimento Informado**

Estamos realizando um estudo sobre a Doença de Ménière no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em conjunto com a PUCRS, tendo o Prof. Dr. Luiz Lavinsky como pesquisador responsável.

A Doença de Ménière se caracteriza por crises de tontura, chiado no ouvido, sensação de ouvido cheio e diminuição da audição. Ela pode ser causada por vários problemas diferentes, sendo preciso conhecer a sua causa para tratar com maior sucesso a doença.

Esse estudo pretende avaliar um novo exame medido no sangue que pode ajudar a identificar uma das causas da Doença de Ménière e, portanto, ajudar a escolher o tratamento ideal para alguns doentes.

Para isso é necessário coletar 5-10ml de sangue (exemplo: 1 colher de sopa) para a realização desse exame. O risco associado a este tipo de coleta é o de poder haver uma pequena mancha na pele por escape de sangue (hematoma), que habitualmente não tem consequência além de um pequeno desconforto local. Nem o(a) Sr(a), nem a equipe médica saberá o resultado do exame durante a pesquisa. Isso é necessário para o sucesso do estudo.

A sua participação poderá ser muito útil para que no futuro esse exame possa ser usado na investigação da Doença de Ménière e na escolha do tratamento ideal dessa doença.

É importante ressaltar que o(a) Sr(a) será atendido e tratado da mesma forma que os outros pacientes com essa doença que não participam do estudo. Os dados coletados com esta pesquisa não serão divulgados individualmente, preservando o anonimato dos participantes do estudo. Em qualquer momento o(a) Sr(a) poderá desistir, sem que isto implique qualquer modificação na continuidade do seu atendimento dentro do Hospital.

Qualquer dúvida poderá ser resolvida com pelo telefone (51) 91237447, telefone da pesquisadora Anne-Rose L. W. Baú.

Eu, _____, após ter sido adequadamente informado do objetivo deste trabalho e do procedimento que serei submetido, concordo em participar do estudo.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Registro HCPA: _____