

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

**MODIFICAÇÕES DAS EMISSÕES OTOACÚSTICAS POR PRODUTOS DE
DISTRORÇÃO DURANTE A HIPERINSULINEMIA PROVOCADA AGUDA EM
MODELO ANIMAL**

Aluno: Francisco Carlos Zuma e Maia

Orientador: Professor Doutor Luiz Lavinsky

Dissertação de Mestrado

2005

À minha mulher, Eliani, que segurou sempre, mesmo quando à distância,
a mão que escreveu este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lavinsky, que foi meu orientador no sentido completo da palavra. Primeiro, convencendo-me e incentivando-me a pesquisar; depois, não deixando nunca que eu desistisse ao longo dos meses da empreitada; e, finalmente, prestando-se a uma revisão crítica e detalhada deste trabalho. Será sempre merecedor do meu profundo respeito e admiração.

À Profa. Dra. Roseli de Oliveira Möllerke, médica veterinária, que tão entusiasmada e generosamente me ajudou nesta pesquisa. Foi incansável, meticulosa e sempre estimulante nas suas buscas. Sem a sua ajuda, tudo teria sido infinitamente mais difícil.

Ao Dr. Marcos Eugênio Soares Duarte, médico veterinário, parceiro incansável nesta jornada. Sua dedicação à pesquisa, aliada ao respeito para com os animais, foi para mim um dos facilitadores na realização deste trabalho.

À Fonoaudióloga Daniela Peres Pereira, que, sem medir esforços, esteve sempre ao meu lado durante todos os experimentos, vibrando a cada passo da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pelo auxílio competente na metodologia estatística.

Ao Prof. Dr. Alexandre Dolganov, que, com seu brilhante conhecimento em pesquisa, ajudou-me de maneira valiosa na elaboração deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Moreira, que me aconselhou, dirigiu e ajudou com competência na realização desta dissertação.

Às Sras. Estela Maris Araripe e Helena Beatriz Silva Costa, secretárias do pós-graduação que, sempre amáveis e atenciosas, merecem meus calorosos agradecimentos.

À Juliana Elert Maia, minha filha e acadêmica de nutrição, por estar ao meu lado me incentivando.

À FIPE, entidade que gentilmente colaborou financeiramente neste trabalho de pesquisa.

Eu não poderia citar todos os nomes de maneira individual. No entanto, peço que todos aqueles que, de alguma forma, ajudaram-me e incentivaram-me a alcançar os objetivos, vejam aqui a expressão da minha profunda gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS (ANEXO).....	8
ABREVIATURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1. Glicose, insulina e patologia da orelha interna.....	18
3.2. Das emissões otoacústicas.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Delineamento da pesquisa.....	27
4.2. Critérios de exclusão e inclusão.....	27
4.3. Experimento.....	27
4.4. Anestesia.....	28
4.5. Cirurgia para exposição do meato acústico externo.....	29
4.6. Métodos de registro das EOA.....	30
4.6.1. Emissões otoacústicas transientes.....	30
4.6.2. Emissões otoacústicas por produtos de distorção.....	31
4.7. Coleta sanguínea de glicose e insulina.....	32
4.8. Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO.....	39

7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS	47
9. ANEXO - TABELAS.....	55
10. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA	66
11. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incisão cirúrgica endo-pré-auricular para melhor visualização do meato acústico externo e da membrana timpânica.....	29
Figura 2 . Fixação e adaptação da sonda estável no meato acústico externo.....	30
Figura 3. Registro das EOATE em ovelhas no tempo zero.....	31
Figura 4. Registro das EOAPD em ovelhas no tempo zero.....	32
Figura 5. Média dos níveis de insulina nos grupos controle e estudo durante 90 minutos.....	34
Figura 6. Média dos níveis de glicose nos grupos controle e estudo durante 90 minutos.....	35
Figura 7. Média dos níveis das EOAPD no grupo controle durante 90 minutos.....	35
Figura 8. Média dos níveis das EOAPD no grupo estudo durante 90 minutos.....	36
Figura 9. Mediana, valores máximos e mínimos dos limiares (dB) nas frequências de 750 a 8.000 Hz dos PD dos grupos controle e estudo durante o tempo de 90 minutos. Note a dispersão de valores mínimos nas altas frequências após o tempo de 60 minutos.....	37

LISTA DE TABELAS (ANEXO)

Tabela 1. Valores de glicose (mg/dl) nos grupos controle e estudo de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	55
Tabela 2. Valores de insulina (μ U/ml) nos grupos controle e estudo de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	56
Tabela 3. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 750 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	57
Tabela 4. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 1.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	58
Tabela 5. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 1.500 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	59
Tabela 6. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 2.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	60
Tabela 7. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 3.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	61
Tabela 8. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 4.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	62
Tabela 9. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 6.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	63
Tabela 10. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 8.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos	64

Tabela 11. Valores mínimos para os produtos de distorção em quatro tempos de registro após a injeção de insulina nos grupos controle e estudo nas oito frequências estudadas	65
--	----

ABREVIATURAS

ATP = adenosina trifosfato

ATPase = adenosina trifosfatase

CCE = células ciliadas externas

DMG = distúrbios do metabolismo dos glicídios

DMNDI = diabetes melito não dependente de insulina

DP = desvio padrão

EOA = emissões otoacústicas

EOAPD = emissões otoacústicas por produtos de distorção

EOATE = emissões otoacústicas transitoriamente evocadas

EV = endovenoso

F1 = frequência do estímulo sonoro 1

F2 = frequência do estímulo sonoro 2

g/l = grama por litro

Hz = hertz

kHz = quilohertz

L1 = intensidade do estímulo sonoro 1

L2 = intensidade do estímulo sonoro 2

mEq = miliequivalente

mg/dl = miligrama por decilitro

ml = mililitro

mmol/l = milimole por litro

mosm/l = osmolaridade por litro

ms = milissegundo

mV = milivolt

μ s = microssegundo

μ U/ml = microunidade por mililitro

NPS = nível de pressão sonora

PD = produto de distorção

U/kg = unidade por quilograma

RESUMO

Introdução: A existência de uma nítida relação entre níveis insulinêmicos anormais e a ocorrência de distúrbios labirínticos tem sido demonstrada em vários trabalhos. Entre as alterações metabólicas, estudos apontam a hiperinsulinemia como sendo uma das causas mais frequentes de síndromes cocleovestibulares.

Objetivo: Neste trabalho, foram monitorizados os limiares das emissões otoacústicas por produtos de distorção durante a hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal, com o objetivo de verificar a existência de alterações eletrofisiológicas nas células ciliadas externas cocleares.

Materiais e método: Foram estudadas sete ovelhas no grupo controle e sete ovelhas no grupo estudo, dosando-se os níveis de insulina e glicose simultaneamente ao registro das emissões otoacústicas por produtos de distorção de 10 em 10 minutos até o tempo de 90 minutos. O grupo controle recebeu soro fisiológico, e o grupo estudo, injeção em bolo de 0,1 U/kg de peso de insulina humana regular. Os resultados foram submetidos à avaliação estatística.

Resultados: O método empregado foi apropriado para promover a hipoglicemia e a hiperinsulinemia desejadas, não havendo modificações nos limiares dos produtos de distorção no grupo controle durante o tempo total do experimento. O grupo estudo apresentou uma diminuição nos limiares dos produtos de distorção em relação ao grupo controle, bem mais nítida nas frequências acima de 1.500 Hz e após o tempo de 60 minutos ($P < 0,001$).

Conclusão: O estudo das emissões otoacústicas durante a hiperinsulinemia provocada aguda em ovelhas determinou uma significativa modificação eletrofisiológica

nas células ciliadas externas da cóclea, verificada pela variação nos limiares dos produtos de distorção nas altas frequências após o tempo de 60 minutos.

ABSTRACT

Background: The existence of a clear relationship between abnormal insulin levels and the occurrence of labyrinth disorders has been demonstrated in several works. Among many metabolic alterations, such studies indicate that hyperinsulinemia is one of the most frequent causes of cochlear and vestibular syndromes.

Objective: Monitor distortion product evoked otoacoustic emission thresholds during induced acute hyperinsulinemia in an animal model so as to identify the occurrence of electrophysiological changes in cochlear outer hair cells.

Material and methods: In the study group, seven sheep received a 0.1 U/kg bolus of regular human insulin. In the control group, seven sheep received saline solution. Insulin and glucose levels were measured simultaneously to the recording of distortion product otoacoustic emissions at 10-minute intervals during 90 minutes. The results were statistically analyzed.

Results: Hypoglycemia and hyperinsulinemia were successfully induced. No changes in distortion product thresholds were detected in the control group during the 90 minutes of the experiment. In the study group, a reduction in distortion product thresholds was recorded in relation to the control group at frequencies above 1,500 Hz and after 60 minutes ($P < 0.001$).

Conclusion: The study of otoacoustic emissions in sheep during induced acute hyperinsulinemia revealed significant electrophysiological changes in cochlear outer hair cells reflected in the variation of distortion product thresholds at high frequencies after 60 minutes.

1. INTRODUÇÃO

A constatação de maior prevalência dos distúrbios do metabolismo dos glicídios (DMG) nos indivíduos portadores de problemas cocleovestibulares quando comparados à população geral é apenas uma evidência indireta de sua importância nas manifestações clínicas apresentadas por esses doentes (1).

Dados da literatura estimam que a ocorrência dos DMG esteja em 42 a 80% dos pacientes portadores de zumbidos e tonturas (2), sintomas de caráter limitante. Portanto, é de grande interesse estudar a gênese e, por conseguinte, os meios de resolução desse problema.

Diversos estudos demonstram a existência de uma nítida relação entre níveis insulinêmicos anormais e a ocorrência de distúrbios labirínticos. Entre as alterações metabólicas, esses estudos apontam o hiperinsulinismo como uma das causas mais freqüentes de síndromes cocleovestibulares (3-10).

Na orelha interna estão provavelmente as mais complexas estruturas do corpo, e uma de suas peculiaridades é conter um fluido rico em potássio (endolinfa), a exemplo do que acontece também no meio intracelular. Uma das explicações da hidropisia endolinfática, que causa tonturas, disacusia e zumbidos, é o bloqueio da atividade da (Na⁺ K⁺) adenosina trifosfatase (ATPase) pela excessiva concentração de insulina no sangue, retendo sódio na endolinfa, expulsando o potássio e carreando maior quantidade de água para o espaço endolinfático. Além disso, a orelha interna possui intensa atividade metabólica e pouca reserva de energia armazenada e depende, para a sua atividade, do suprimento constante do oxigênio e da glicose sangüínea. Esses dois fatos explicam a valorização dos distúrbios glicoinulinêmicos causando transtornos cocleovestibulares (9,10).

Diversos autores (11-17) acreditam que a hiperinsulinemia precede em alguns anos o desenvolvimento de diabetes melito não dependente de insulina (DMNDI) ou tipo II, representando, assim, o extremo de um *continuum* de anormalidade da homeostase dos carboidratos. Hiperinsulinemia é, portanto, condição *sine qua non* para o desenvolvimento de DMNDI.

Com a finalidade de avaliar o declínio do desempenho da orelha interna diante de alterações no metabolismo dessas substâncias, alguns autores (18-20) se utilizaram de meios eletrofisiológicos, particularmente do microfonismo coclear.

Atualmente, um novo recurso eletrofisiológico, as emissões otoacústicas (EOA), está disponível para a aferição da fisiologia das células ciliadas externas (CCE) cocleares, sendo um método objetivo e sensível para estabelecer as modificações do funcionamento coclear nesse nível (21-28). Há evidências de que pequenas alterações do funcionamento coclear podem ser detectadas pelas EOA antes mesmo de se verificar qualquer mudança na audiometria (29).

Diante disso, propusemo-nos a utilizar o recurso acima referido, a saber, as EOA, na pesquisa experimental com ovelhas. O caráter original deste estudo, por conseguinte, está relacionado tanto ao fato de ser o único que analisa as respostas das EOA por hiperinsulinemia provocada aguda, quanto ao animal utilizado.

Partindo da hipótese operacional de que há modificações das respostas das emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOAPD) na vigência de distúrbio do metabolismo dos glicídios, nosso objetivo é monitorar a funcionalidade coclear da perspectiva das CCE durante a hiperinsulinemia provocada aguda.

2. OBJETIVO

Determinar se ocorrem alterações eletrofisiológicas das CCE cocleares através do estudo das EOAPD durante a hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Glicose, insulina e patologia da orelha interna

A participação das alterações do metabolismo dos glicídios na etiopatogenia das síndromes cocleovestibulares é inegável (30,31). Jordão (apud 32) foi o primeiro a relacionar distúrbios labirínticos e alterações metabólicas em um grupo de pacientes com disacusia sensorial e diabetes melito. Jorgensen (33) encontrou alterações histopatológicas na estria vascular de 32 ossos temporais de pacientes diabéticos, e Goldman (34), estudando um grupo de 75 pacientes com síndrome de Ménière e hipoglicemia, encontrou 90% de melhora em seus pacientes com a utilização de extrato adrenocortical associado a dieta nutricional. Observação similar em casos de síndrome de Ménière foi publicada por Powers (35).

Os líquidos da orelha interna, endolinfa e perilinfã, são essenciais para o seu funcionamento. Eles transmitem o estímulo mecânico sonoro ou vestibular para as células ciliadas sensoriais e, com a participação da endolinfa, transformam este sinal em uma mensagem nervosa.

As características físicas e químicas da endolinfa e da perilinfã são bem conhecidas (36). Na perilinfã, o cátion principal é o sódio, o ânion principal é o cloro e a concentração de proteínas é fraca (~1 g/l). A endolinfa tem uma composição completamente original: é um líquido rico em potássio (150 a 180 mmol/l), praticamente desprovido de sódio (1 mmol/l) e com hiperosmolaridade (340 mosm/l) no primeiro giro da cóclea do rato. Existe, ainda, um potencial transepitelial positivo em relação ao plasma e à perilinfã (+100 mV na cóclea e ~5 mV no vestíbulo). No saco endolinfático, o líquido luminal tem uma composição mais variável, que difere por vezes da endolinfa e da perilinfã ($K^+ = 13$ mmol/l; $Na^+ = 100$ mmol/l; proteína = 30 g/l), com potencial transepitelial de +10 mV.

Os mecanismos de secreção e reabsorção da endolinfa são parcialmente elucidados. Está bem estabelecido que a endolinfa é formada a partir da perilinfa, por meio da estria vascular na cóclea e pelas *dark cells* no vestíbulo. O papel das outras estruturas do labirinto membranoso, em particular na reciclagem de K^+ e na absorção de Na^+ , não está perfeitamente determinado. Na estria vascular, um co-transporte $Na-K-2Cl$, uma $Na^+-K^+-ATPase$ basolateral e um canal IsK apical estão implicados na secreção de K^+ . No saco endolinfático, sede da reabsorção da endolinfa, foi identificada uma $H^+-ATPase$ do tipo vacuolar e um co-transporte $Na-K-2Cl$ no pólo apical do epitélio.

Os mecanismos de regulação, em particular hormonal, que concorrem para a homeostasia desses líquidos são ainda imperfeitamente conhecidos. Certos receptores foram identificados, porém seu papel e implicação nas condições patológicas ainda precisam ser determinados.

Mendelson & Roderique (20) pesquisaram a concentração de sódio e potássio na endolinfa de cobaias antes e após hipoglicemia provocada pela infusão de insulina. Constataram que a concentração de potássio caiu de 147,8 mEq/l para 57,1 mEq/l e que a de sódio aumentou de 5,8 mEq/l para 96,4 mEq/l após 3 horas.

Koyde et al. (18) conduziram um extenso estudo da ação da insulina na orelha interna de ratos. Após a administração de 80 U/kg de peso, eles observaram um decréscimo na amplitude do microfonismo coclear. Esse decréscimo na amplitude começou 3 horas após a administração da droga, até atingir um platô em aproximadamente 80 minutos. A administração de glicose e de outros substratos do ciclo de Krebs produziram uma parcial recuperação na amplitude do microfonismo coclear. Os autores concluíram que a redução na concentração de carboidratos e/ou substratos do ciclo de Krebs foram os fatores determinantes no decréscimo da amplitude. Entretanto, as análises químicas do sangue coletado durante o período de redução do microfonismo coclear indicavam que os níveis

de glicose e substratos nesses animais não atingiram os níveis críticos. Após testes com diferentes hipóteses, os autores concluíram que a ação da insulina na redução do microfonismo coclear era causada pela diminuição na concentração de oxigênio na orelha interna.

As pesquisas realizadas em modelo animal com o intuito de estudar alterações endococleares demonstram intensa atividade metabólica na orelha interna dependente do suprimento de oxigênio e praticamente não apresentando energia armazenada (7). Assim, seu metabolismo depende diretamente do suprimento de oxigênio e da perfusão da glicose. Alterações no fluxo sanguíneo ou metabólico, portanto, têm grande potencial para alterar a homeostase da orelha interna (13). D'Avila & Lavinsky (12) estudaram o perfil glicídico e suas correlações na doença de Ménière e demonstraram que 72% dos pacientes estudados tinham graus variáveis de hiperinsulinemia, possíveis de serem detectados nas curvas insulinêmicas de 5 horas.

A dupla função da insulina em nível celular é bem conhecida (11): ela carrega glicose para o meio celular e regula o transporte iônico através da membrana celular. Situações associadas com hiperinsulinemia interferem não somente nos níveis de glicemia, mas também, e com maior importância, na atividade da bomba sódio/potássio ATPase. Essa bomba tem como função manter altas concentrações de potássio e baixa concentração de sódio na endolinfa, tal como ocorre no espaço intracelular. Pacientes com hiperinsulinemia apresentam elevada concentração de sódio e reduzida concentração de potássio em nível endolinfático, alterando, assim, o potencial endococlear e, conseqüentemente, a resposta do mecanismo coclear. A persistência dessa desordem metabólica resulta em injúria das CCE e em lesão nas vias eferentes do sistema auditivo.

Pacientes hiperglicêmicos podem apresentar alterações cocleovestibulares por meio de três mecanismos, atuando isoladamente ou em associação: neuropatia do oitavo par

craniano, vasculopatia dos pequenos vasos e interferência na bomba sódio/potássio ATPase na orelha interna, especialmente na estria vascular. Os dois primeiros mecanismos de ação são relevantes em pacientes que apresentam diabetes melito severo, representando as principais lesões nas vias cocleovestibulares.

A característica básica da etiopatogenia do estado de tolerância diminuída à glicose, bem como do estado de hiperinsulinemia normoglicêmica (diabetes oculto), é a interferência na ação da bomba sódio/potássio ATPase. Embora eles representem mais uma forma tênue das alterações do metabolismo dos glicídios, mudanças na orelha interna são possíveis nesses pacientes, devido à modificação no nível de atividade da bomba sódio/potássio ATPase na estria vascular. Os envoltimentos cocleovestibulares podem sempre ser encontrados, mesmo em estágios incipientes de mudanças metabólicas envolvendo a glicose e a insulina (12).

Mangabeira Albernaz & Fukuda (7) demonstraram que 82% dos pacientes com zumbidos e história clínica sugestiva de disglícemia apresentaram curvas anormais de glicemia e insulinemia de 5 horas, onde a hiperinsulinemia foi o achado mais freqüente. Spencer Jr. (5) demonstrou que pacientes com zumbidos e alterações metabólicas tiveram uma melhora dos sintomas após dieta; achados semelhantes foram descritos por Kraft (37).

Lavinsky et al. (3), estudando 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações cocleovestibulares, concluíram que o hiperinsulinismo e a hipoglicemia foram achados muito prevalentes na história clínica, com 96% de valor preditivo positivo, sugerindo a importância da realização da curva glicêmica e insulinêmica de 5 horas no diagnóstico das disglícemias.

Lavinsky et al. (11) relacionaram a hiperinsulinemia e pacientes com zumbidos associados ou não a disacusia neurossensorial e verificaram uma melhora dos sintomas após mudanças nutricionais.

As alterações metabólicas dos carboidratos podem ser distinguidas em quatro diferentes entidades clínicas, cada uma apresentando características e aspectos específicos, de acordo com os achados laboratoriais, que, atualmente, representam diferentes estágios do mesmo processo fisiopatológico (11,37-40).

1. Hiperinsulinemia com euglicemia. Esse distúrbio do metabolismo dos glicídios pode ser considerado como o início do processo. Parece atuar exclusivamente no envolvimento com a orelha interna, podendo preceder em vários anos o desenvolvimento de DMNDI. Por essa razão, foi chamada originalmente de diabetes melito oculto (16,41,42).
2. Hiperinsulinemia com hipoglicemia reacional (3,20,43,44).
3. Hiperinsulinemia com reduzida tolerância à glicose. Representa um estágio intermediário entre os casos de DMNDI precedente e clinicamente manifesto (41).

Vale ressaltar que a hiperinsulinemia isolada pode freqüentemente desenvolver hiperinsulinemia com reduzida tolerância à glicose, mesmo se o paciente não apresentar qualquer hipoglicemia (41).

4. Hiperinsulinemia com hiperglicemia. Essa corresponde ao DMNDI, apresentando um alto potencial de envolvimento além da orelha interna, como rins, olhos e sistema cardiovascular (41).

A seqüência acima mostra como a hiperinsulinemia indubitavelmente precede a hiperglicemia (45-47). Como já mencionado, vários autores (15-17) acreditam que a hiperinsulinemia precede em alguns anos o desenvolvimento de DMNDI, representando o

extremo de um *continuum* da anormalidade da homeostase dos carboidratos. A presença da hiperinsulinemia é, portanto, essencial para o desenvolvimento de DMIND (15-17).

3.2. Das emissões otoacústicas

Ao longo da última década, as EOA, um método diagnóstico moderno, não-invasivo e objetivo, têm sido usadas no estudo detalhado dos aspectos mecânicos da função coclear. As EOA definem as respostas que a cóclea emite em forma de energia acústica.

Embora sua existência tenha sido prevista por Gold & Pumphrey (48), elas foram demonstradas apenas três décadas mais tarde por Kemp (49) e foram registradas como vibrações acústicas no canal auditivo utilizando métodos e equipamentos especializados. Esse método de medição se baseia nos processos ativos da cóclea. Trata-se de um mecanismo rápido, que não depende de cálcio nem da adenosina trifosfato (ATP), que não consome energia. A contração das CCE, ou eletromotilidade, é o resultado da soma de contrações de elementos motores localizados na membrana lateral das CCE. Atualmente, considera-se que a despolarização das CCE (entrada de K⁺ no momento da estimulação sonora) modifica a conformação de uma proteína transmembranária, a prestina, que atua como elemento motor (50,51).

Sabe-se, atualmente, que a grande maioria das fibras neuronais aferentes, responsáveis pelo envio da mensagem sonora às vias auditivas superiores, não se encontra nas CCE, mais sim nas células ciliadas internas, e que estas somente seriam estimuladas diretamente com sons de moderada/alta intensidade. Assim, para que sejam excitadas até mesmo com sons de baixa intensidade, há a necessidade de uma ampliação dos movimentos de vibração da membrana basilar. As CCE fazem da cóclea um verdadeiro amplificador mecânico, permitindo um aumento de até 50 dB de intensidade de estímulo (52).

A eletromotilidade das CCE vai gerar uma energia mecânica dentro da cóclea, a qual será retransmitida em forma de som através da orelha média, vibrando a membrana timpânica. Então, ao se produzir um sinal acústico, as EOA poderão ser registradas por um sensível microfone localizado no meato acústico externo (21).

Existem dois tipos de EOA: espontâneas e evocadas. EOA espontâneas são sinais de baixa intensidade medidos no meato acústico externo na ausência de qualquer estimulação acústica, ocorrendo em mais de 60% das pessoas com audição normal (53). O segundo tipo de EOA, usado com frequência na clínica, são as chamadas evocadas, e aparecem em consequência de um estímulo acústico. As EOA evocadas são subdivididas em evocadas transitórias (EOAET) e produtos de distorção (EOAPD).

As EOAET são registradas após a apresentação de um estímulo do tipo clique ou *burst* (54). Como o estímulo é um clique de banda larga, toda a porção da membrana basilar é estimulada, e a resposta é uma expressão da cóclea por inteiro, não informando a respeito de locais específicos.

As EOAPD constituem o tipo de emissão acústica mais empregado na prática clínica. Kemp (55) as define como uma energia acústica medida no meato acústico externo originando-se da cóclea pela interação não-linear de dois tons puros aplicados simultaneamente.

Os produtos de distorção (PD) refletem a integridade da cóclea no local da membrana basilar, que é associado com o centro geométrico da frequência dos dois tons puros primários (F1 e F2). Para emprego clínico, as duas frequências primárias devem ser geometricamente centradas por volta das frequências audiométricas usualmente testadas (0,750 - 1 - 1,5 - 2 - 3 - 4 - 6 - 8 kHz).

A maioria das experiências (56) revela que os PD mais evidentes, isto é, com maior amplitude, surgem numa frequência que pode ser calculada pela expressão matemática $2F1$

- F2, onde F1 é diferente de F2, na qual os estímulos L1 e L2 têm uma diferença de 10 dB do nível de pressão sonora (NPS) ou mais entre si. Também tem sido observado que sua amplitude é maior quando a razão entre F1 e F2 ($F2/F1$) é igual a 1,22. O exame nos fornece uma representação gráfica que se denomina audiococleograma (57), que seria o correspondente ao *DPgram* no idioma inglês.

Sendo um método mais sensível que a audiometria tonal, a monitorização auditiva por meio das EOA evocadas é utilizada na clínica em casos de perda auditiva induzida pelo ruído, ototoxicidade e doença de Ménière. Na hidropisia endolinfática ou doença de Ménière, a presença ou ausência das EOAPD ajudam a estabelecer se a doença está compensada (perda auditiva flutuante) ou descompensada (perda auditiva definitiva) (52).

Alterações rápidas de sensibilidade em frequências graves ocorrem nos primeiros dias da instalação da hidropisia em cobaias, com alterações nos limiares de EOAPD nas frequências correspondentes à diminuição de sensibilidade (58). Desde que as células ciliadas não estejam destruídas durante os primeiros estágios da doença, os autores supõem que isso ocorra devido a alterações dos micromecanismos tanto hidromecânico como biomecânico que afetam a transmissão do estímulo pela célula ciliada externa do órgão de Corti. É provável que muitos fatores sejam responsáveis pelos complexos mecanismos da perda auditiva observada na doença de Ménière. Apesar de sabermos que o aumento de pressão endolinfática atua direta ou indiretamente sobre a CCE, ainda é difícil correlacionar os achados experimentais obtidos em animais com os sintomas encontrados em humanos (59).

Assim, as EOAPD podem mostrar alterações cocleares precoces na doença de Ménière que ainda não são detectadas na audiometria tonal e em exames convencionais (58).

Murbach (60), estudando a variação na amplitude das EOAPD durante a curva glicêmica e insulinêmica de 3 horas, verificou que havia uma variação negativa em pacientes com hiperinsulinemia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento da pesquisa

Este é um estudo experimental conduzido na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O cálculo do tamanho da amostra foi avaliado por meio de um estudo piloto ($n = 3$) para cada grupo, com as mesmas características do experimento propriamente dito.

4.2. Critérios de exclusão e inclusão

Foram excluídos animais nos seguintes casos:

- Quando, por razões anatômicas do meato acústico externo, não houve condições de execução do teste.
- Por morte do animal no decorrer do procedimento anestésico.

Foram incluídos os animais que:

- Obtiveram mais de 50% de reprodutibilidade nas EOATE, bem como a presença dos PD no tempo zero do experimento.

4.3. Experimento

O estudo seguiu os princípios internacionais para o manuseio dos animais (61).

Quatorze ovelhas macho da raça *Textel*, com peso vivo médio de 40 kg e idade em torno de 18 meses, foram divididos e randomizados em dois grupos. Os experimentos não produziram desconforto nos animais, pois eles estiveram sob sedação e anestesia geral, (detalhes do protocolo anestésico são apresentados na seção a seguir). O estudo foi do tipo

agudo, sem necessidade de observação posterior. Após os experimentos, os animais retornaram ao seu local de origem, não sendo necessário sacrificá-los.

1. **Grupo controle (n = 7).** Cada animal ficou em jejum prévio por 48 horas. Foram administrados 20 ml de soro fisiológico por via endovenosa após o tempo zero de registro simultâneo das EOA e coleta sangüínea de glicose e insulina, e em intervalos de 10 minutos até um total de 90 minutos.
2. **Grupo estudo (n = 7).** Cada animal ficou em jejum prévio por 48 horas. Foi administrada insulina regular na dose de 0,1 U/kg de peso diluída em 10 ml de soro fisiológico por via endovenosa (injeção em bolo) após o tempo zero do registro simultâneo das EOA e coleta sangüínea de glicose e insulina, e em intervalos de 10 minutos até um total de 90 minutos.

4.4. Anestesia

Para a sedação, foi utilizada acepromazina (Acepran) na dose de 500 mg/kg por via intramuscular. Na indução anestésica, utilizamos tiopental sódico (Tiopental) 15 mg/kg endovenoso (EV); para a manutenção, o mesmo anestésico foi utilizado, na dose de 600 mg/hora em infusão contínua em bomba (B-Braum Nutrimat II). O bloqueio local na região auricular junto ao trago foi realizado com cloridrato de bupivacaína 0,75% na dose de 75 mg/bloqueio.

Dez minutos após a pré-medicação, a anestesia era induzida com tiopental, e o animal intubado com tubo traqueal nº 8-9 acoplado a carro de anestesia com sistema fechado (marca Narcosul, modelo Modulus 4000), com fornecimento de oxigênio 100%. Foram monitorados os parâmetros anestésicos de saturação de oxigênio, pulso cardíaco (oxímetro marca Ohmeda, modelo Biox 3700e), volume corrente, frequência respiratória (Takaoka, modelo Venticare) e temperatura retal (Sheridan, modelo Sontemp 400/700).

A recuperação anestésica total ocorreu em aproximadamente 2 horas, sem incidentes. Em seguida, os animais foram transportados ao seu local de origem, onde foram tomadas as providências para a recuperação da ferida operatória.

4.5. Cirurgia para exposição do meato acústico externo

Foi realizada incisão cirúrgica com bisturi elétrico (marca Medecir, modelo BMO-870), após bloqueio local com cloridrato de bupivacaína 0,75%, de aproximadamente dois centímetros endo-pré-auricular (Figura 1), com o objetivo de melhor visualização do meato acústico externo e da membrana timpânica e colocação da sonda para realização das EOA (Figura 2).



Figura 1. Incisão cirúrgica endo-pré-auricular para melhor visualização do meato acústico externo e da membrana timpânica.



Figura 2 . Fixação e adaptação da sonda estável no meato acústico externo.

4.6. Métodos de registro das EOA

Durante os registros, a temperatura corpórea de cada animal foi mantida em $37 \pm 0,5$ °C por intermédio de um colchão térmico da marca Termway.

Os níveis de ruído ambiente durante todo o procedimento não ultrapassaram 65,5 dB (A).

4.6.1. Emissões otoacústicas transientes

As respostas das EOATE (Figura 3) foram registradas por aparelho da marca Madsen, modelo Capella, acoplado ao Notebook Toshiba Satellite. Os parâmetros utilizados foram realizados no modo *fast screen*, com estímulo (clique) de duração de 40 μ s e intensidade de 80 dB NPS, com polaridade de condensação. Para a análise dos dados, consideramos somente os segmentos dos registro na janela de 3 a 12,50 ms.

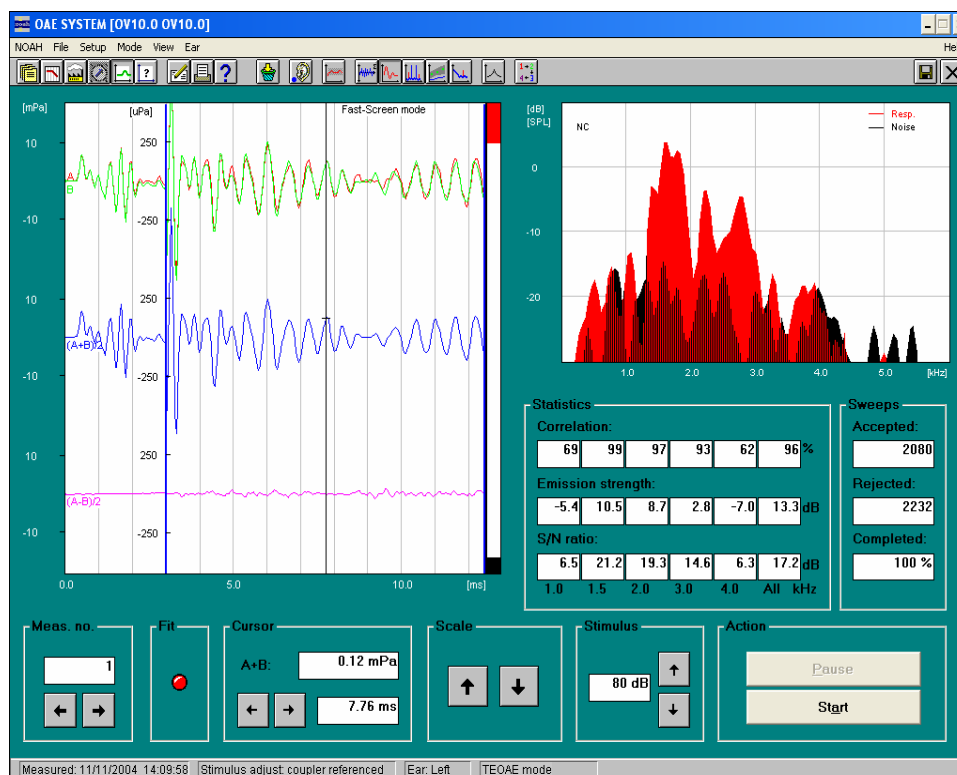


Figura 3. Registro das EOATE em ovelhas no tempo zero.

4.6.2. Emissões otoacústicas por produtos de distorção

As EOAPD (Figura 4) foram registradas pelo mesmo equipamento utilizado para as EOATE. Os parâmetros utilizados foram de PD1 = 2F1 - F2 com uma relação F1 : F2 = 1,22. Os níveis de intensidade foram F1 = 65 e F2 = 55 dB.

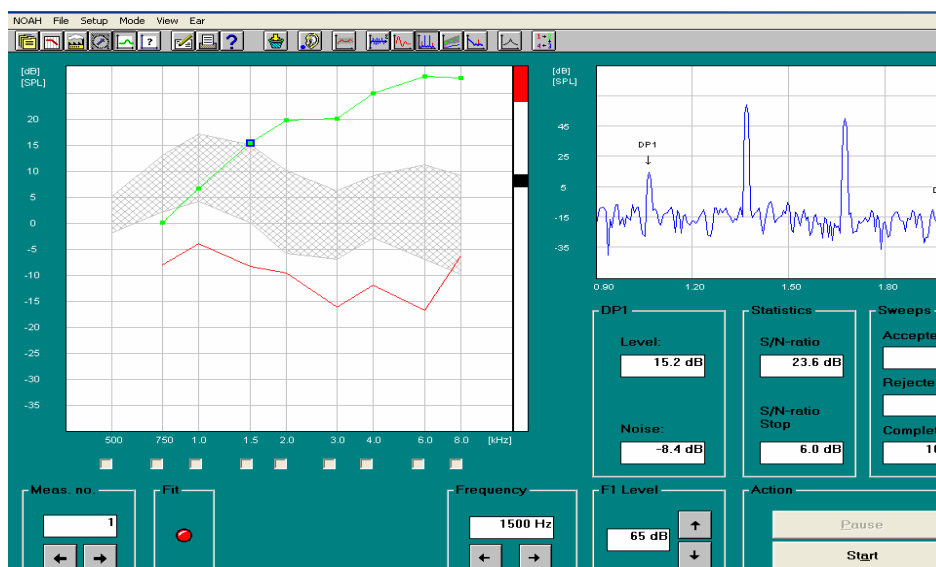


Figura 4. Registro das EOAPD em ovelhas no tempo zero.

Para a análise das EOAPD, utilizamos os limiares de intensidade em dB das frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000 Hz.

4.7. Coleta sanguínea de glicose e insulina

Cada animal foi submetido a punção da veia jugular para coleta sanguínea e posterior análise de glicose pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase, com a utilização do kit da Labtest e insulina por imunoensaio de eletroquimioluminescência, utilizados nos analisadores Modular Analytics E170 da Roche em intervalos de 10 minutos até o total de 90 minutos.

4.8. Análise estatística

Os dados foram transferidos para um programa estatístico computadorizado (*Statistical Package for the Social Sciences – SPSS 13.0*) para análise.

Para o grupo piloto, foi utilizado o teste t para a comparação de dois grupos com magnitude do efeito de 2 desvio padrão (DP), com $\alpha = 0,05$ e poder de 90%, dando uma estimativa de seis animais por grupo.

No experimento, foi realizado o teste binomial para avaliar se a ocorrência de valores mínimos nos limiares (dB) dos PD nas frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000 Hz, nos tempos de 60, 70, 80 e 90 minutos, foram os mesmos entre os grupos controle e estudo.

5. RESULTADOS

Todos os animais se comportaram de maneira dócil durante o período pré-operatório (indução anestésica) e pós-operatório imediato. Não houve casos de hemorragia; apenas um caso de morte por aspiração pulmonar no grupo controle.

O método empregado promoveu a hipoglicemia e a hiperinsulinemia desejadas, como pode ser visto nas Figuras 5 e 6 e nas Tabelas 1 e 2 (Anexo), que apresentam valores máximo e mínimo, média e DP de glicose e insulina.

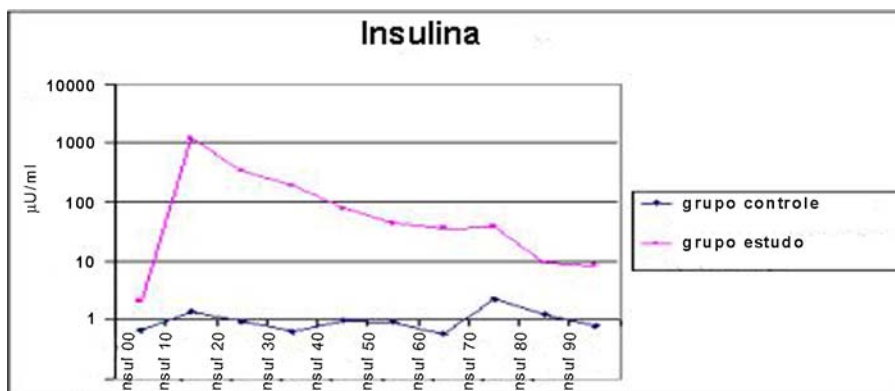


Figura 5. Média dos níveis de insulina nos grupos controle e estudo durante 90 minutos.

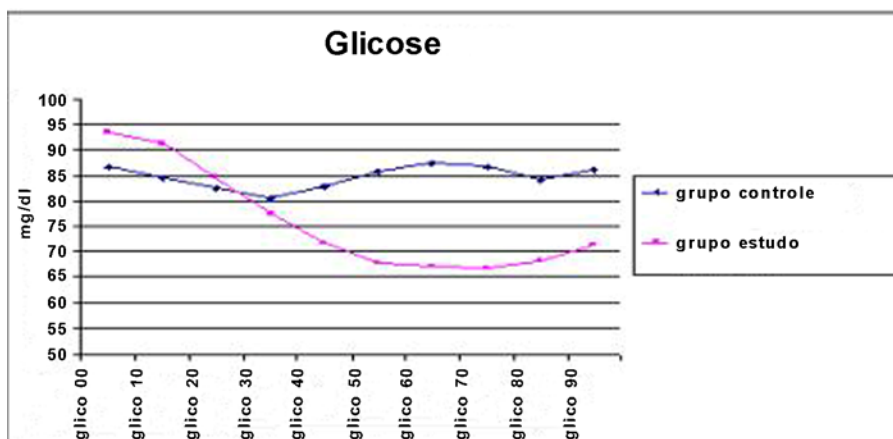


Figura 6. Média dos níveis de glicose nos grupos controle e estudo durante 90 minutos.

Não houve modificações nos limiares (dB) dos PD no grupo controle em relação aos níveis de glicose e insulina durante 90 minutos (Figura 7).

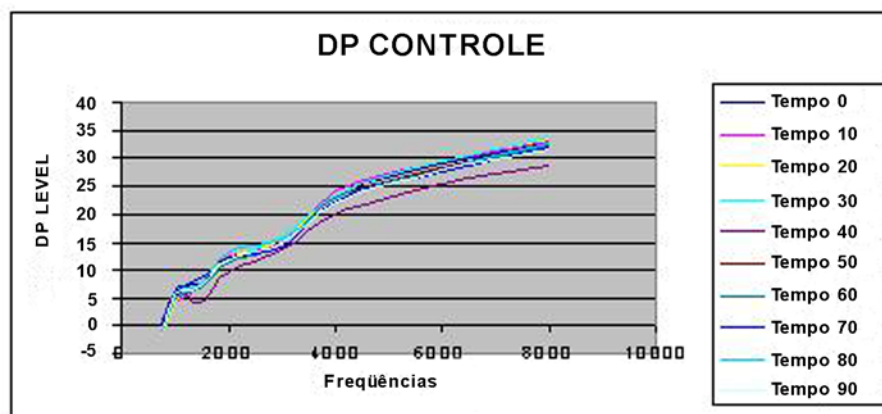


Figura 7. Média dos níveis das EOAPD no grupo controle durante 90 minutos.

Na Figura 8, há uma diminuição dos limiares (dB) dos PD nas frequências de 750 a 8.000 Hz no grupo estudo de acordo com o tempo.

As Tabelas 3 a 10 (Anexo) indicam os limiares mínimos, máximos, médias e DP dos PD nas frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000 Hz, respectivamente, para os grupos controle e estudo.

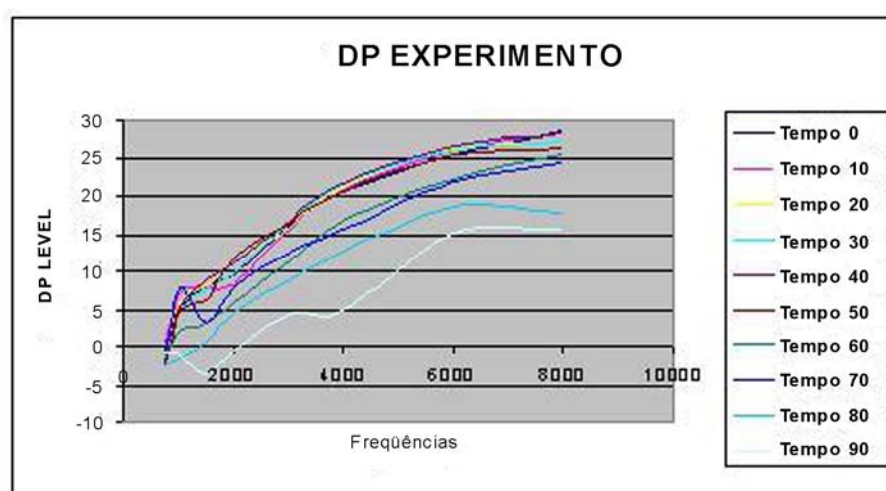


Figura 8. Média dos níveis das EOAPD no grupo estudo durante 90 minutos.

A Tabela 11 (Anexo) mostra os limiares (dB) mínimos observados para os PD em quatro tempos a partir de 60 minutos de registro após a injeção de insulina no grupo estudo nas oito frequências estudadas.

O grupo estudo apresenta uma ocorrência de eventos mínimos muito maior (28 x 4) em termos de registros de PD, o que fica nítido nas frequências acima de 1.500 Hz ($P < 0,001$) (Figura 9).

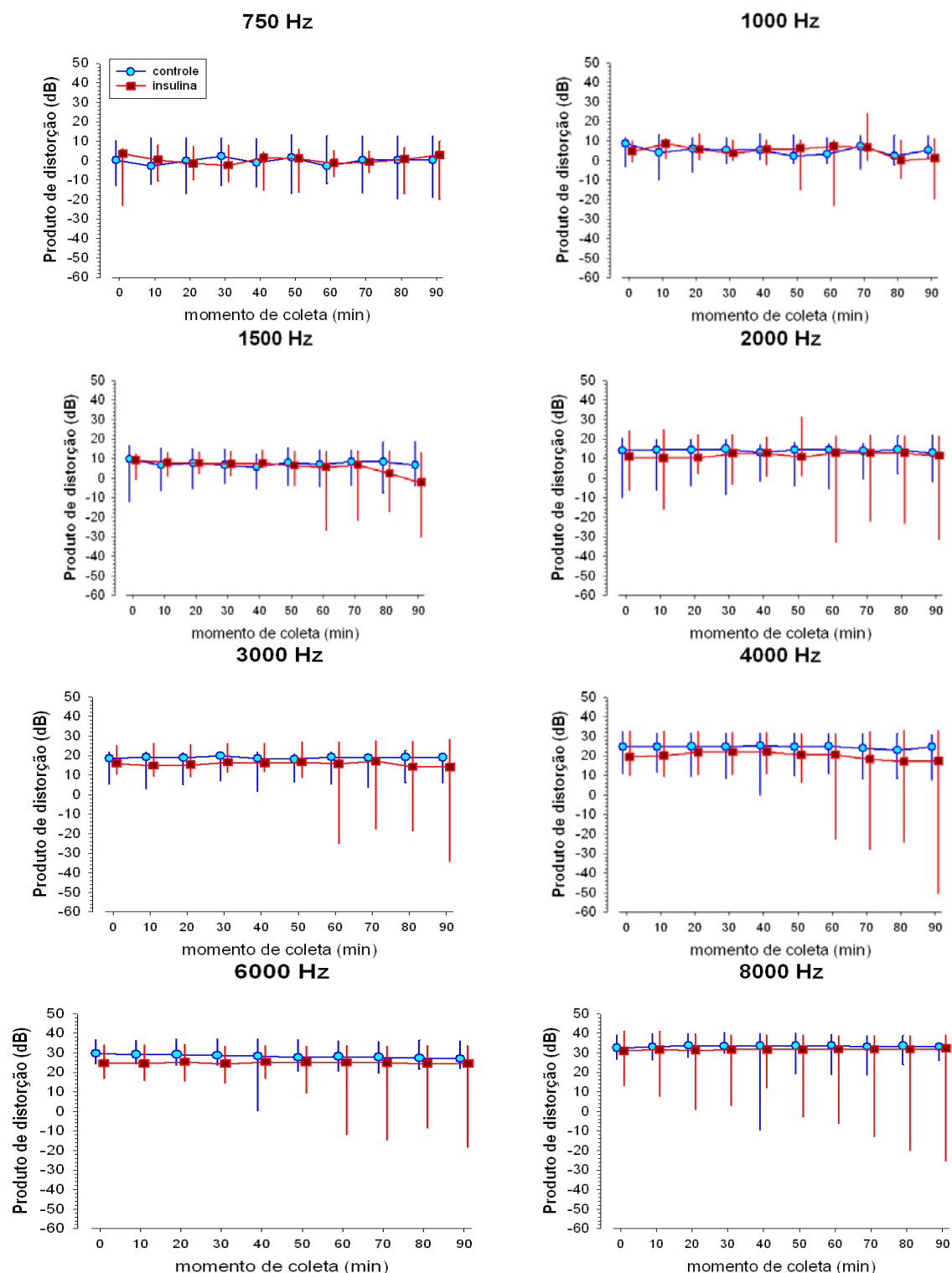


Figura 9. Mediana, valores máximos e mínimos dos limiares (dB) nas freqüências de 750 a 8.000 Hz dos PD dos grupos controle e estudo durante o tempo de 90 minutos. Note a dispersão de valores mínimos nas altas freqüências após o tempo de 60 minutos.

A estimulação utilizada (insulina) não mudou as medianas dos grupos controle e estudo.

6. DISCUSSÃO

A orelha interna sofre a influência de pequenas variações nos níveis plasmáticos de glicose e insulina pela presença de receptores insulínicos no saco endolinfático (62) e de transportadores de glicose na estria vascular (63). A hipoglicemia e a presença de altos níveis de insulina interferem nas atividades iônica e energética, indispensáveis para o adequado funcionamento dessa estrutura.

Distúrbios cocleovestibulares causados por anormalidades no metabolismo dos glicídios são freqüentes na prática clínica. A demonstração de que o diabetes oculto precede o desenvolvimento da tolerância diminuída à glicose e o DMNDI nos leva a dar um alto valor à hiperinsulinemia como a chave da mudança metabólica a ser procurada quando existe a suspeita dessa possibilidade diagnóstica.

Clinicamente, foi demonstrado que a hiperinsulinemia representa melhor o início das modificações consistentes no diagnóstico desse tipo de desordem metabólica do que a hipoglicemia, devido à grande sensibilidade da curva insulinêmica em comparação com a curva glicêmica (2,7,64). A principal limitação da curva glicêmica isolada é a possível ocorrência de episódios de picos hipoglicêmicos nos intervalos entre as coletas, resultando em resultados falso-negativos. É também conhecido que a maioria dos episódios de hipoglicemia ocorre mais de 3 horas após a administração de glicose oral. Isso explica a baixa sensibilidade do teste tradicional de tolerância à glicose no diagnóstico dessa condição, consistindo de duas tomadas (jejum e 2 horas após a administração de 75 mg de glicose). Assim, Lavinsky et al. (3), que estudaram 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações cocleovestibulares, concluíram que o hiperinsulinismo e a hipoglicemia foram achados muito prevalentes na história clínica, com 96% de valor

preditivo, sugerindo a importância da realização da curva glicêmica e insulinêmica de 5 horas no diagnóstico das disglicemias.

O principal objetivo deste estudo foi mostrar se havia modificações eletrofisiológicas nas CCE cocleares através do estudo das EOAPD após hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal.

Para demonstrar de maneira consistente a gênese dos danos cocleares durante essa condição de hiperinsulinemia aguda, lançamos mão do protocolo de injeção em bolo de 0,1 U/kg de insulina regular, tal como é empregada na técnica do teste de tolerância à insulina (65), onde a taxa de redução da glicose é avaliada ao longo de 15 minutos após a injeção de insulina, sendo o principal teste para o diagnóstico da deficiência do hormônio do crescimento. Em nosso estudo, foi possível obter uma resposta apropriada para promover a hipoglicemia e a hiperinsulinemia desejadas.

As médias dos valores obtidos neste estudo nas análises das concentrações plasmáticas de glicose e insulina no grupo controle foram as mesmas encontradas na literatura veterinária (66,67) que utilizou o mesmo kit comercial empregado em humanos.

Revisando a literatura, não encontramos trabalhos experimentais que apresentassem qualquer similitude com a nossa investigação, não obstante a importância do tema. Podemos citar apenas a observação de um caso clínico (68) em que uma paciente com amenorréia primária e suspeita de hipogonadismo, que foi submetida a hipoglicemia insulínica para investigação, apresentou desaparecimento das EOA durante o período de hipoglicemia, fortalecendo a hipótese de que a hipoglicemia altera a funcionalidade da orelha interna.

A utilização da ovelha como modelo animal de experimentação para pesquisa otológica, em que Lavinsky & Goycoolea (69) foram os pioneiros, deve-se ao fato de que se trata do animal de escolha do grupo ao qual estamos vinculados.

Os animais atualmente utilizados para o desenvolvimento de pesquisa e treinamento, como cães, gatos e macacos, têm um porte distinto do ser humano e são de difícil manuseio no biotério, por serem agressivos e suscetíveis a doenças. Além disso, muitas vezes esses animais são caros e pouco disponíveis, e vários são animais de estimação, podendo o seu uso para treinamento e pesquisa determinar repercussões psicossociais e causar conflitos com sociedades protetoras de animais.

A ovelha, por sua alta disponibilidade, tendo em vista sua utilização para a produção de carne e lã, é um animal dócil para manuseio em laboratório. Além de rudes, são menos suscetíveis a doenças, não requerendo tantos cuidados quanto cães, gatos e macacos. Podem, ainda, retornar para as fazendas após a realização dos experimentos, não havendo necessidade de um biotério especial com gaiolas. Esse fato contribui para a redução de custos e proporciona mais conforto aos animais, além de evitar sua exposição a doenças que podem ser contraídas em laboratório.

Outros trabalhos (69-72) mostram semelhanças significativas entre a anatomia, a histologia e a morfometria da orelha da ovelha e dos seres humanos, principalmente em relação ao porte das estruturas, o que facilita o estudo de ordem cirúrgica, bem como os relacionados com aferições da neurofisiologia otológica. As características e vantagens do uso desse animal puderam ser comprovadas igualmente em nosso estudo.

O procedimento anestésico utilizado possibilitou a realização do experimento e garantiu uma baixa morbidade. Apenas um animal (de um total de 18) morreu, devido a uma complicação por aspiração pulmonar.

A exposição do meato acústico externo por meio de uma incisão endo-pré-auricular foi de fundamental importância para ver a membrana timpânica, bem como para a perfeita adaptação e vedação do meato acústico externo na execução do teste das EOA, garantindo, assim, o monitoramento coclear sem qualquer interferência durante todo o experimento,

com uma constância na qualidade do registro e, em conseqüência, uma homogeneidade nos resultados. Desta maneira, conseguimos registrar pela primeira vez o perfil dos limiares de EOAPD (audiococleograma) em ovelhas (grupo controle).

Inúmeras são as técnicas que podem ser utilizadas para monitorar a função auditiva. As EOATE e EOAPD, como representantes das condições de funcionamento das CCE, são testes de aplicação clínica recente e vêm assumindo importância significativa na identificação de alterações cocleares, principalmente por se tratar de um exame objetivo, não-invasivo e de fácil aplicação. Mesmo não determinando o limiar auditivo e não substituindo a audiometria tonal, a imitanciometria ou a audiometria de tronco encefálico, esses novos exames podem detectar sinais iniciais de danos cocleares.

Valendo-se das EOATE, onde a estimulação se distribui e atua sobre uma larga porção da membrana basilar, estimulando-a de maneira global, e tendo, portanto, o espectro freqüencial de suas respostas sofrido influência do status de toda a cóclea, utilizamos o parâmetro de reprodutibilidade acima de 50% como critério de inclusão no estudo do tempo zero do experimento de cada animal, pois, a partir desse nível, os achados não são artefactuais e, portanto, tornam-se confiáveis.

A amplitude das respostas captadas nas EOAPD apresentou uma tendência de crescimento em direção às freqüências mais altas. É possível que a distribuição tonotópica coclear facilite essa maior amplitude em agudos, uma vez que estes estão localizados na base da cóclea, região proximal ao local de captação das EOA. Gorga et al. (73) sugerem alguns fatores como responsáveis pelas baixas respostas em estímulos de baixas freqüências. Um deles seria a baixa relação sinal/ruído para as freqüências graves, e outro fator seria o modo de transferência de energia pelo sistema da orelha média, que apresenta menor amplificação para graves. Ainda segundo o autor, essa característica da orelha média interfere na transmissão dos graves, tanto na direção da orelha média para a cóclea

(estímulo) quanto na direção inversa, da cóclea para a orelha média (resposta). O conjunto desses fatores parece fazer com que as medidas das EOAPD captadas na altura do meato acústico externo apresentem amplitudes menores em baixas frequências, tornando difícil a distinção entre as emissões e o ruído de fundo.

Por serem procedimentos que empregam metodologias distintas, as EOATE e as EOAPD talvez possam ter indicações também diferentes (74). As EOATE podem ser preferencialmente adotadas para fins de investigação seletiva da audição. Por serem sensíveis a pequenas alterações, resultados falhos no exame estariam indicando a necessidade de uma avaliação mais ampla da audição. Desta forma, as EOATE continuam sendo o procedimento de escolha para a triagem universal neonatal. Já as EOAPD, que são mais específicas quanto à estimulação da cóclea, realizam análise seletiva freqüencial, geram respostas mais precisas e identificam limiares auditivos em torno de 40 dB, são mais indicadas para a investigação diagnóstica da integridade coclear.

O nosso estudo permite considerar relevantes os seguintes aspectos:

- Não houve variações nos limiares (dB) dos PD no grupo controle em relação aos níveis de insulina e glicose durante os 90 minutos do experimento, mantendo estáveis as características do audiococleograma, que passa a ser nosso padrão de normalidade em ovelhas.
- O achado de maior relevância nessa pesquisa foi a constatação de que, no grupo estudo, houve uma diminuição significativa nos limiares dos PD em relação ao grupo controle, diminuição esta que foi bem mais nítida nas frequências acima de 1.500 Hz e após 60 minutos ($P < 0,001$). Esse dado permite inferir que houve alterações eletrofisiológicas nas CCE, principalmente na espira basal da cóclea.

Resta saber se a diminuição dos limiares dos PD nas frequências acima de 1.500 Hz encontradas neste trabalho foi resultado da baixa nos níveis de glicose ou da hiperinsulinemia.

Koyde et al. (18) e Mendelson & Roderique (20) se utilizaram do microfonismo coclear para avaliar o declínio do desempenho da orelha interna diante das alterações no metabolismo dos glicídios. Para tal, ministraram grandes doses de insulina em cobaias e coelhos, demonstrando que, após 3 horas, havia alterações iônicas entre a endolinfa e perilinfa e que a falta do substrato glicídico não era o fator primordial na diminuição do microfonismo coclear.

As CCE são responsáveis pela amplificação sonora de uma frequência específica, num processo denominado eletromotilidade, resultante das mudanças dos fluidos nas membranas das CCE. Portanto, é possível que os achados deste estudo sejam resultantes da ação da insulina de forma aguda e elevada, e que, após 60 minutos, comece a haver uma influência na eletromotilidade das frequências altas.

De Pirro et al. (75) demonstraram experimentalmente que a hiperinsulinemia está associada à redução dos receptores periféricos de insulina em pacientes obesos. O aumento da resistência à insulina leva a hiperinsulinemia e hiperglicemia. Esses fatores diminuem a atividade da bomba Na-K-ATPase, tendo como consequência o aumento do sódio na endolinfa, podendo gerar hidropisia.

Trabalhos experimentais de Horner (76), onde o autor provocou hidropisia em cobaias, revelaram alterações nas CCE da espira apical, enquanto que as da espira basal ficaram preservadas. A teoria formulada pelo autor se deve ao maior tamanho dos estereocílios das CCE, que aumentam progressivamente até o ápice. Essa alteração pode ocorrer devido à quebra das pontes interciliares. A presença de hidropisia dentro do espaço endolinfático pode forçar a membrana basilar para baixo ou a membrana tectorial para

cima, introduzindo tensão e quebrando as pontes de ligação interciliares. Um segundo mecanismo que deve ser valorizado para explicar essas alterações é o mecanismo de feedback eferente, que pode controlar e proteger seletivamente a espira basal da cóclea, onde termina a maioria das fibras cruzadas mediais.

Parece-nos que as alterações nas altas frequências encontradas no nosso estudo decorrem somente do fato de o estímulo de insulina ser da forma aguda, a qual interferiria na eletrofisiologia celular, porém sem condições de tempo suficiente para gerar o processo hidrópico, base do estudo acima referido.

As alterações eletrofisiológicas da cóclea e os distúrbios metabólicos dos glicídios nas suas correlações são de difícil consecução, podendo as EOAPD se tornar o meio possível para este fim.

7. CONCLUSÃO

O estudo das EOA em ovelhas durante a hiperinsulinemia provocada aguda determinou uma significativa modificação eletrofisiológica nas CCE cocleares, evidente por meio da variação nos limiares dos PD nas altas frequências após o tempo de 60 minutos.

8. REFERÊNCIAS

1. Bittar RSM, Bottino MA, Simoceli L, Venosa AR. Labirintopatia secundária aos distúrbios do metabolismo do açúcar: realidade ou fantasia? *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(6):800-5.
2. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Doenças metabólicas da orelha interna. *RBM-Otorrinolaringologia.* 1995;2(1):18-22.
3. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbidos. *Rev Bras Med.* 2000;7(1):8-12.
4. Updegraff WR. Vertigo in diabetic patients. Presented at the 60th Scientific Meeting of the Neurootological and Equilibrimetric Society. 1979 June 14-16; Turku, Finland.
5. Spencer Jr JT. Hyperlipoproteinemia, hyperinsulinemia and Ménière's disease. *South Med J.* 1981;74:1194-200.
6. Proctor CA. Abnormal insulin levels and vertigo. *Laryngoscope.* 1981;91:1657-62.
7. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.
8. Ganança MM, Caovilla HH, Gananca FF, Serafini F. Dietary management for tinnitus control in patients with hyperinsulinemia. *Int Tinnitus J.* 1995;1(1):41-5.
9. Ramos S. Labirintopatias por distúrbios do metabolismo dos glicídios: evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais com uso de dieta nutricional [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1987.

10. Ramos S, Ramos FR. Síndromes cócleo-vestibulares por distúrbios do metabolismo dos glicídios. Tratamento com dietas nutricionais e evolução dos sintomas e limiares tonais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993;59(2):112-20.
11. Lavinsky L, Oliveira HJC, D'Avila C, Wolf ML. Hiperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J.* 2004;10(1):24-30.
12. D'Avila C, Lavinsky L. Glucose and insulin profiles and their correlations in Meniere's disease. In press.
13. Fukuda Y. Glicemia, insulinemia e patologia da orelha interna [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1982.
14. Ganança MM. A vertigem tem cura? O que aprendemos nestes últimos 30 anos. São Paulo: Lemos; 1998.
15. Kraft JR. Hyperinsulinemia: the common denominator of subjective idiopathic tinnitus and other idiopathic central and peripheral neurootologic disorders. *Int Tinnitus J.* 1995;1(1):46-52.
16. Harris MI, Klein ER, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 years before clinical diagnosis. *Diabetes Care.* 1992;15:815-9.
17. Daves MJ, Raymond NT, Day JL, Hales CN, Burden AC. Impaired glucose tolerance and fasting hyperglycaemia have different characteristics. *Diabetes Med.* 2000;17:433-40.
18. Koyde Y, Tajima S, Yoshida M, Konno M. Biochemical changes in the inner ear induced by insulin, in relation to the cochlear microphonics. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1960;69:1083-97.
19. Wing KG. The experimental use of hypoglycemia to show whether glucose is a major fuel for the cochlear response, and further remarks concerning the lability of the vascular bed supplying the cochlear partition. *Acta Otolaryngol.* 1959;148:87-93.

20. Mendelson M, Roderique J. Cationic changes in endolymph during hypoglycemia. *Laryngoscope*. 1972;82:1533-40.
21. Kemp DT, Ryan S, Bray P. A guide to the effective use of otoacoustic emissions. *Ear Hear*. 1990;11:93-105.
22. Zweig G, Shera CA. The origin of periodicity in the spectrum of evoked otoacoustic emission. *J Acoust Soc Am*. 1998;2018-47.
23. Shera CA, Guinan JJ. Evoked otoacoustic emissions arise by two fundamentally different mechanisms: a taxonomy for mammalian OAEs. *J Acoust Soc Am*. 1999;105:782-98.
24. Horner K, Cazals Y. Distortion products in early stage experimental hydrops in the guinea pig. *Hear Res*. 1989;43:71-9.
25. Hauser R, Probst R. The influence of systematic primary-tone level variation L2-L1 on the acoustic distortion product emission $2f_1-f_2$ in normal human ears. *J Acoust Soc Am*. 1991;89:280-6.
26. Mills DM, Norton SJ, Rubel EW. Vulnerability and adaptation of distortion product otoacoustic emissions to endocochlear potential variation. *J Acoust Soc Am*. 1993;105:782-98.
27. Whitehead ML, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. Evidence for two discrete sources of $2f_1-f_2$ distortion product otoacoustic emissions in rabbit. II: Differential physiological vulnerability. *J Acoust Soc Am*. 1992;92:2662-82.
28. Whitehead ML, McCoy MJ, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. Dependence of distortion product otoacoustic emissions on primary levels in normal and impaired ears. I. Effects of decreasing L2 below L1. *J Acoust Soc Am*. 1995;97:2346-58.
29. Carnicelli MVF. O uso das emissões otoacústicas no diagnóstico e prevenção da perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR). In: Nudelmann AA, Costa EA, Seligman

- J, Ibanez RN. Perda auditiva induzida por ruído. Porto Alegre: Bagagem Comunicação; 1997. p. 237-45.
30. Parker W. Meniere's disease – etiologic considerations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121:377-82.
 31. Updegraff WR. Impaired carbohydrate metabolism in idiopathic Meniere's disease. *Ear Nose Throat.* 1977;56:160-3.
 32. Rust KR, Prazma J, Triana RJ, Michaelis OE, Pillsbury HC. Inner ear damage secondary to diabetes mellitus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992;118:397-400.
 33. Jorgensen MB. Changes of aging in the inner ear, and the inner ear in diabetes mellitus. *Histological studies. Acta Otolaryngol.* 1963;12(suppl. 188):125-8.
 34. Goldman HB. Hypoadrenocorticism and endocrinologic treatment of Meniere's disease. *N Y State J Med.* 1962;62:377-82.
 35. Powers WH. Metabolic aspect of Meniere's disease. *Laryngoscope.* 1982;82:1716-25.
 36. Sterkers O, Ferrary E, Grayeli AB, Couloigner V, Boucara D. Les liquides de l'oreille interne: aspects cliniques. 36 ème Symposium de la SIONO. 2002; Marrakech, Marrocos.
 37. Kraft JR. Hyperinsulinemia: a merging history with idiopathic tinnitus, vertigo and hearing loss. *Int Tinnitus J.* 1998;4(2):127-30.
 38. Kraft JR. Detection of diabetes mellitus in situ (occult diabetes). *Lab Med.* 1975;6:0-22.
 39. Kraft JR. The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association, 1999. *Diabetes Care.* 1999;22(1):5-19.

40. Malerbi DA, Franco LJ. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care*. 1992;15:1509-16.
41. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 1979;28:1039-57.
42. Colman PG, Thomas DW, Zimmet PZ, Welborn TA, Garcia-Webb P. Position statement: new classification and criteria for diagnosis of diabetes mellitus. *Med J Aust*. 1999;170:375-8.
43. Service FJ. Hypoglycemia. *Med Clin North Am*. 1995;79:1-8.
44. Johnson DD, Dorr KE, Swenson WM, Service FJ. Reactive hypoglycemia. *JAMA*. 1980;21(243):1151-5.
45. Felig P. Disorders of carbohydrate metabolism. In: Bondy PK, Rosenberg LE, eds. *Metabolic control and disease*. Philadelphia: Saunders; 1980. p. 276-392.
46. De España R, Biurrun O, Lorente J, Traserra J. Hearing and diabetes. *ORL J*. 1995;57:325-7.
47. Kirtane MV, Medikeri SB, Rao P. Blood levels of glucose and insulin in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1984;406:42-5.
48. Gold T, Pumphrey RJ. Hearing. I. The cochlea as a frequency analyzer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1948;135:462-91.
49. Kemp DT. Simulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am*. 1978;64:1386-91.
50. Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*. 2000;405(6783):149-55.

51. Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*. 2002;419(6904):300-4.
52. Lopes Filho O, org. *Tratado de fonoaudiologia*. São Paulo: Roca; 1997.
53. Burns EM, Arehart KH, Campbell SL. Prevalence of spontaneous otoacoustic emissions in neonates. *J Acoust Soc Am*. 1992;91:1571-5.
54. Johnsen NJ, Elberling C. Evoked acoustic emissions from the human ear. I. Equipment and response parameters. *Scand Audiol*. 1988;11:3-12.
55. Kemp DT. Evidence of mechanical nonlinearity and frequency selective wave amplification in the cochlea. *Arch Otorhinolaryngol*. 1979;224:37-45.
56. Lonsbury-Martin BL, Whitehead ML, Martin GK. Clinical applications of otoacoustic emissions. *J Speech Hear Res*. 1991;34:964-81.
57. Lopes Filho O, Carlos RC, Redondo MC. Produtos de distorção das emissões otoacústicas. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 1995;61(6):485-94.
58. Aquino AMCM, Massaro CAM, Tiradentes JB, Garzón JCV, Oliveira JAA. Emissões otoacústicas no diagnóstico precoce de lesão coclear na doença de Ménière. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002;68(5):761-6.
59. Horner CK. Distortion products in early stage experimental hydrops in the guinea pig. *Hear Res*. 1989;4-3:71-80.
60. Murbach VF. *Variações na amplitude das emissões otoacústicas por produtos de distorção durante a curva glicêmica e insulinêmica [tese de doutorado]*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 2000.
61. National Library of Medicine, American Physiological Society (APS). APS guiding principles in the care and use of animals. Available at: <http://www.the-aps.org/publications/journals/guide.htm>.

62. Knight LC, Saeed SR, Hradek GT, Schindler RA. Insulin receptors on the endolymphatic sac: an autoradiographic study. *Laryngoscope*. 1995;105(6):635-8.
63. Yoshihara T, Satoh M, Yamamura Y, Itoh H, Ishii T. Ultrastructural localization of glucose transporter 1 (GLUT1) in guinea pig stria vascularis and vestibular dark cell areas: an immunogold study. *Acta Otolaryngol*. 1999;119(3):336-40.
64. Fukuda Y. Açúcar: amigo ou vilão? Barueri: Manole; 2004.
65. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Atheros*. 2002;13(2):42-9.
66. Stumpf W, López J. Efeito da dieta na concentração ruminal de ácido propiônico e níveis plasmáticos de glicose e insulina. In: Anais da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2000; Viçosa, Brasil.
67. López J, Stumpf J. Influência do grão de sorgo como fonte de amido em ovinos alimentados com feno. Parâmetros plasmáticos. *Rev Bras Zootec*. 2000;29(4):1183-90.
68. Sant'anna GD, Lavinsky L, Schmid H, Zwetsch I. Desaparecimento das emissões otoacústicas durante hipoglicemia insulínica – relato de caso. Anais da 13ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 1993 Nov 8-10; Porto Alegre, Brasil. p. 148.
69. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thomsen J, eds. *Otitis media today*. Copenhagen: Kugler; 1997. p. 1-8.
70. Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança MM, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1999;119:522-7.

71. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico do osso temporal da ovelha com o objetivo da realização de cirurgia experimental e treinamento em cirurgia otológica. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
72. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico da orelha interna através da tomografia computadorizada [tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
73. Gorga MP, Neely ST, Ohlrich B, Hoover B, Redner J, Peters J. From laboratory to clinic: a large scale study of distortion product otoacoustic emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. *Ear Hear.* 1997;18(6):440-55.
74. Carvallo RMM, Sanches SGG, Ravagnani MP. Amplitude das emissões otoacústicas transientes e por produtos de distorção em jovens e idosos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2000;66(1):38-45.
75. De Pirro R, Fusco A, Lauro R, Testa I, Ferreti F, De Martinis C. Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* 1980;29:96-9.
76. Horner CK. Hypersensitivity of hydroptic ears, at frequencies with normal thresholds, to temporary threshold shifts. *Hear Res.* 1990;48:281-6.

9. ANEXO - TABELAS

Tabela 1. Valores de glicose (mg/dl) nos grupos controle e estudo de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
Glicose tempo 00	7	64	110	86,57	17,096
Glicose tempo 10	7	63	108	84,43	17,038
Glicose tempo 20	7	61	104	82,57	16,501
Glicose tempo 30	7	59	99	80,43	15,131
Glicose tempo 40	7	56	103	82,86	18,343
Glicose tempo 50	7	56	133	85,86	25,426
Glicose tempo 60	7	55	155	87,29	32,587
Glicose tempo 70	7	55	157	86,71	33,400
Glicose tempo 80	7	54	145	84,14	29,521
Glicose tempo 90	7	54	142	86,14	28,316
Estudo					
Glicose tempo 00	7	68	117	93,43	17,386
Glicose tempo 10	7	77	115	91,29	15,628
Glicose tempo 20	7	70	110	84,57	15,820
Glicose tempo 30	7	61	105	77,57	17,155
Glicose tempo 40	7	58	101	71,71	17,942
Glicose tempo 50	7	53	98	67,86	18,096
Glicose tempo 60	7	49	95	67,14	17,818
Glicose tempo 70	7	45	93	66,71	18,455
Glicose tempo 80	7	43	90	68,14	20,037
Glicose tempo 90	7	41	100	71,43	22,397

Tabela 2. Valores de insulina ($\mu\text{U/ml}$) nos grupos controle e estudo de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
Insulina tempo 00	7	0,20	1,54	0,6643	0,53045
Insulina tempo 10	7	0,20	4,97	1,3946	1,66716
Insulina tempo 20	7	0,20	2,13	0,9526	0,79745
Insulina tempo 30	7	0,20	1,42	0,6284	0,51442
Insulina tempo 40	7	0,20	1,59	0,9784	0,59888
Insulina tempo 50	7	0,20	1,99	0,9059	0,64223
Insulina tempo 60	7	0,20	1,53	0,5843	0,48988
Insulina tempo 70	7	0,20	11,15	2,2064	3,97875
Insulina tempo 80	7	0,20	4,32	1,2177	1,58273
Insulina tempo 90	7	0,20	1,98	0,7887	0,77678
Estudo					
Insulina tempo 00	7	0,20	5,92	2,0557	2,24372
Insulina tempo 10	7	434,00	2480,00	1183,5429	706,38859
Insulina tempo 20	7	147,80	557,10	332,5571	140,77740
Insulina tempo 30	7	59,25	420,80	188,1786	113,21621
Insulina tempo 40	7	19,93	132,80	76,2200	35,38539
Insulina tempo 50	7	8,46	125,40	43,6543	39,07469
Insulina tempo 60	7	4,70	65,09	35,0757	20,74162
Insulina tempo 70	7	3,75	194,40	37,8071	69,16725
Insulina tempo 80	7	1,99	20,25	9,2557	5,69572
Insulina tempo 90	7	1,66	20,54	8,2543	6,05124

Tabela 3. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 750 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 750 Hz tempo 00	7	-12,90	10,30	-0,1000	8,90824
PD 750 Hz tempo 10	7	-12,20	11,80	-0,9143	9,12313
PD 750 Hz tempo 20	7	-17,10	11,90	-1,5143	10,18519
PD 750 Hz tempo 30	7	-12,90	11,80	1,5571	8,63189
PD 750 Hz tempo 40	7	-13,70	11,40	1,2286	9,81321
PD 750 Hz tempo 50	7	-16,90	13,50	-0,1429	11,21084
PD 750 Hz tempo 60	7	-12,00	12,90	-0,6000	8,85306
PD 750 Hz tempo 70	7	-16,50	12,80	0,1429	10,32583
PD 750 Hz tempo 80	7	-19,80	12,80	-1,0143	12,09276
PD 750 Hz tempo 90	7	-19,10	12,80	-0,3286	10,80304
Estudo					
PD 750 Hz tempo 00	7	-22,90	6,20	-2,2714	10,77493
PD 750 Hz tempo 10	7	-10,60	8,10	0,5571	6,08081
PD 750 Hz tempo 20	7	-9,80	7,40	-0,5714	5,68381
PD 750 Hz tempo 30	7	-10,90	8,10	-1,1429	6,61913
PD 750 Hz tempo 40	7	-15,30	4,80	-0,5286	6,86287
PD 750 Hz tempo 50	7	-16,10	5,90	-1,9857	7,90874
PD 750 Hz tempo 60	7	-8,20	5,40	-1,1857	4,63157
PD 750 Hz tempo 70	7	-6,30	4,90	-0,6857	4,51753
PD 750 Hz tempo 80	7	-16,90	6,60	-2,4571	9,27988
PD 750 Hz tempo 90	7	-20,00	10,00	-0,7857	10,63256

Tabela 4. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 1.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 1.000 Hz tempo 00	7	-3,10	11,70	6,4857	5,64666
PD 1.000 Hz tempo 10	7	-10,00	13,30	4,2143	8,20029
PD 1.000 Hz tempo 20	7	-5,80	11,60	4,4429	6,51993
PD 1.000 Hz tempo 30	7	-1,50	11,70	6,1286	5,43713
PD 1.000 Hz tempo 40	7	0,40	13,90	5,9286	5,37888
PD 1.000 Hz tempo 50	7	-1,60	13,10	5,2143	6,39047
PD 1.000 Hz tempo 60	7	-1,60	11,80	4,8714	5,54578
PD 1.000 Hz tempo 70	7	-4,40	12,90	6,0143	6,28316
PD 1.000 Hz tempo 80	7	-2,30	12,90	4,8571	6,59769
PD 1.000 Hz tempo 90	7	0,50	12,90	5,8286	4,81723
Estudo					
PD 1.000 Hz tempo 00	7	-0,90	10,10	4,8429	4,17327
PD 1.000 Hz tempo 10	7	0,90	11,50	7,1143	4,40773
PD 1.000 Hz tempo 20	7	0,40	13,70	5,9143	5,55020
PD 1.000 Hz tempo 30	7	0,00	10,40	4,7286	4,06108
PD 1.000 Hz tempo 40	7	-2,20	10,30	5,4000	4,62241
PD 1.000 Hz tempo 50	7	-14,80	10,40	4,7714	8,90051
PD 1.000 Hz tempo 60	7	-23,10	10,40	2,0143	11,74811
PD 1.000 Hz tempo 70	7	-0,10	24,30	7,7571	8,57571
PD 1.000 Hz tempo 80	7	-9,30	10,30	-1,4571	7,07834
PD 1.000 Hz tempo 90	7	-19,50	11,40	-1,0714	10,74968

Tabela 5. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 1.500 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 1.500 Hz tempo 00	7	-11,80	16,70	7,4857	9,08762
PD 1.500 Hz tempo 10	7	-6,40	15,60	7,1000	7,11524
PD 1.500 Hz tempo 20	7	-5,60	15,20	7,5571	6,67654
PD 1.500 Hz tempo 30	7	-2,70	14,80	7,3571	5,69206
PD 1.500 Hz tempo 40	7	-5,50	12,50	4,2143	7,16180
PD 1.500 Hz tempo 50	7	-3,70	15,70	7,2429	6,62014
PD 1.500 Hz tempo 60	7	-4,60	14,40	6,6857	6,25791
PD 1.500 Hz tempo 70	7	-3,70	14,40	8,3714	5,90782
PD 1.500 Hz tempo 80	7	-7,40	18,40	7,7000	8,27204
PD 1.500 Hz tempo 90	7	-4,00	18,80	6,9714	7,14673
Estudo					
PD 1.500 Hz tempo 00	7	-0,90	12,50	7,9714	4,37825
PD 1.500 Hz tempo 10	7	1,00	13,00	7,8143	3,84336
PD 1.500 Hz tempo 20	7	2,20	13,50	7,9857	3,58442
PD 1.500 Hz tempo 30	7	1,30	13,90	7,5143	4,52932
PD 1.500 Hz tempo 40	7	5,20	14,30	8,8000	3,70405
PD 1.500 Hz tempo 50	7	-3,80	13,90	6,3286	6,03951
PD 1.500 Hz tempo 60	7	-26,60	13,80	3,1143	13,79172
PD 1.500 Hz tempo 70	7	-21,60	14,00	3,1571	12,17495
PD 1.500 Hz tempo 80	7	-17,20	14,20	0,6000	10,70701
PD 1.500 Hz tempo 90	7	-30,20	13,20	-3,4571	15,27185

Tabela 6. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 2.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 2.000 Hz tempo 00	7	-10,00	20,50	11,9000	9,98666
PD 2.000 Hz tempo 10	7	-6,10	19,70	12,4286	8,45611
PD 2.000 Hz tempo 20	7	-4,00	19,70	12,2143	7,64099
PD 2.000 Hz tempo 30	7	-8,40	19,70	11,6857	9,26560
PD 2.000 Hz tempo 40	7	-1,40	17,10	9,7571	7,67286
PD 2.000 Hz tempo 50	7	-4,30	18,40	12,0143	7,69316
PD 2.000 Hz tempo 60	7	-5,50	17,40	11,5429	7,82578
PD 2.000 Hz tempo 70	7	-0,50	17,70	12,3143	6,25764
PD 2.000 Hz tempo 80	7	2,20	21,40	13,2714	6,13480
PD 2.000 Hz tempo 90	7	-1,80	21,80	12,0000	7,30274
Estudo					
PD 2.000 Hz tempo 00	7	-6,30	24,40	9,5286	9,98527
PD 2.000 Hz tempo 10	7	-16,00	24,80	8,2429	13,01459
PD 2.000 Hz tempo 20	7	2,20	22,30	11,0143	6,84773
PD 2.000 Hz tempo 30	7	-3,20	22,20	9,8714	8,28004
PD 2.000 Hz tempo 40	7	1,10	21,20	11,0714	7,36336
PD 2.000 Hz tempo 50	7	1,30	31,30	11,6714	9,96088
PD 2.000 Hz tempo 60	7	-32,90	21,50	5,8286	18,40957
PD 2.000 Hz tempo 70	7	-21,90	22,00	7,7286	14,30638
PD 2.000 Hz tempo 80	7	-22,90	21,70	4,9286	15,41717
PD 2.000 Hz tempo 90	7	-31,50	21,70	-,3571	21,76502

Tabela 7. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 3.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 3.000 Hz tempo 00	7	5,40	21,80	15,7000	6,51102
PD 3.000 Hz tempo 10	7	3,10	21,80	15,1286	7,73385
PD 3.000 Hz tempo 20	7	5,00	21,70	15,6857	6,64967
PD 3.000 Hz tempo 30	7	6,90	21,10	16,2429	6,49458
PD 3.000 Hz tempo 40	7	1,50	21,90	13,5857	7,83314
PD 3.000 Hz tempo 50	7	6,50	21,00	15,0571	6,09805
PD 3.000 Hz tempo 60	7	5,20	21,80	14,8714	6,74431
PD 3.000 Hz tempo 70	7	3,80	20,40	14,1429	6,99067
PD 3.000 Hz tempo 80	7	5,90	22,70	15,5714	6,57716
PD 3.000 Hz tempo 90	7	6,10	19,70	14,9857	6,12493
Estudo					
PD 3.000 Hz tempo 00	7	10,30	25,30	16,2143	4,96166
PD 3.000 Hz tempo 10	7	9,40	26,30	15,8429	5,47596
PD 3.000 Hz tempo 20	7	9,00	25,50	15,9429	5,34661
PD 3.000 Hz tempo 30	7	11,50	26,30	16,7286	5,20599
PD 3.000 Hz tempo 40	7	11,80	26,30	16,9143	4,97173
PD 3.000 Hz tempo 50	7	8,60	26,90	16,5143	5,78660
PD 3.000 Hz tempo 60	7	-25,10	26,80	11,3857	16,74420
PD 3.000 Hz tempo 70	7	-17,80	27,50	12,7143	14,26890
PD 3.000 Hz tempo 80	7	-18,70	27,40	8,8143	17,13918
PD 3.000 Hz tempo 90	7	-34,30	28,40	4,3000	22,80577

Tabela 8. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 4.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 4.000 Hz tempo 00	7	10,80	32,20	23,4714	6,55559
PD 4.000 Hz tempo 10	7	11,80	31,80	24,0000	6,33614
PD 4.000 Hz tempo 20	7	9,40	31,70	23,6714	7,17837
PD 4.000 Hz tempo 30	7	8,40	31,80	23,6714	7,57027
PD 4.000 Hz tempo 40	7	0,00	31,80	20,2143	11,61772
PD 4.000 Hz tempo 50	7	9,70	31,50	23,0714	7,41995
PD 4.000 Hz tempo 60	7	10,60	31,40	23,0429	7,26220
PD 4.000 Hz tempo 70	7	8,10	31,40	22,3143	8,20212
PD 4.000 Hz tempo 80	7	8,40	31,20	22,2571	7,90609
PD 4.000 Hz tempo 90	7	7,80	30,60	22,1714	7,67131
Estudo					
PD 4.000 Hz tempo 00	7	10,20	32,80	20,5143	8,16750
PD 4.000 Hz tempo 10	7	9,50	32,80	20,7571	8,31542
PD 4.000 Hz tempo 20	7	10,30	32,40	21,2143	7,88531
PD 4.000 Hz tempo 30	7	10,30	31,90	21,4143	7,73012
PD 4.000 Hz tempo 40	7	10,70	32,00	21,5571	7,81406
PD 4.000 Hz tempo 50	7	6,20	31,40	20,5286	8,84001
PD 4.000 Hz tempo 60	7	-22,70	31,40	16,6714	18,34727
PD 4.000 Hz tempo 70	7	-27,70	32,50	15,6571	20,27140
PD 4.000 Hz tempo 80	7	-24,30	32,90	12,7000	20,47503
PD 4.000 Hz tempo 90	7	-50,50	33,10	4,6714	32,16000

Tabela 9. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 6.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 6.000 Hz tempo 00	7	24,30	36,70	28,9000	4,23950
PD 6.000 Hz tempo 10	7	24,10	36,30	29,3714	4,07787
PD 6.000 Hz tempo 20	7	23,70	37,00	29,4429	4,43729
PD 6.000 Hz tempo 30	7	23,70	36,90	29,6429	4,52396
PD 6.000 Hz tempo 40	7	0,20	37,00	25,3286	12,08797
PD 6.000 Hz tempo 50	7	20,50	36,60	28,1429	5,88242
PD 6.000 Hz tempo 60	7	20,40	36,20	28,0429	5,93713
PD 6.000 Hz tempo 70	7	19,50	35,90	27,7714	6,13398
PD 6.000 Hz tempo 80	7	21,40	36,40	27,9429	6,01051
PD 6.000 Hz tempo 90	7	22,00	36,00	27,9571	5,78989
Estudo					
PD 6.000 Hz tempo 00	7	16,80	34,10	25,4000	7,13816
PD 6.000 Hz tempo 10	7	15,80	33,90	25,9286	6,91513
PD 6.000 Hz tempo 20	7	15,60	34,20	26,1571	6,98209
PD 6.000 Hz tempo 30	7	14,30	33,50	26,0571	7,18096
PD 6.000 Hz tempo 40	7	16,90	33,60	26,5286	6,71806
PD 6.000 Hz tempo 50	7	9,40	33,30	25,3857	8,75622
PD 6.000 Hz tempo 60	7	-11,80	33,70	22,2000	16,03101
PD 6.000 Hz tempo 70	7	-14,60	33,40	21,7714	16,93081
PD 6.000 Hz tempo 80	7	-8,60	33,80	18,4571	18,77808
PD 6.000 Hz tempo 90	7	-18,30	33,80	15,1286	22,44510

Tabela 10. Limiares dos produtos de distorção na frequência de 8.000 Hz de 10 em 10 minutos durante 90 minutos

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle					
PD 8.000 Hz tempo 00	7	26,50	39,00	32,8857	3,81289
PD 8.000 Hz tempo 10	7	26,10	39,80	33,1000	4,02989
PD 8.000 Hz tempo 20	7	27,80	39,70	33,5429	3,49183
PD 8.000 Hz tempo 30	7	29,60	40,40	33,8714	3,23919
PD 8.000 Hz tempo 40	7	-9,60	39,90	28,4571	16,94136
PD 8.000 Hz tempo 50	7	19,30	40,10	32,4429	6,29440
PD 8.000 Hz tempo 60	7	18,90	39,40	32,3143	6,31174
PD 8.000 Hz tempo 70	7	18,40	38,90	31,9286	6,34999
PD 8.000 Hz tempo 80	7	23,80	38,70	32,8000	4,46468
PD 8.000 Hz tempo 90	7	25,80	33,40	31,5000	2,83314
Estudo					
PD 8.000 Hz tempo 00	7	13,10	41,30	28,3714	10,08674
PD 8.000 Hz tempo 10	7	7,80	41,10	28,1286	11,70993
PD 8.000 Hz tempo 20	7	1,00	39,80	27,1000	13,51197
PD 8.000 Hz tempo 30	7	3,10	39,20	27,0429	12,89171
PD 8.000 Hz tempo 40	7	12,00	39,20	28,2286	10,28765
PD 8.000 Hz tempo 50	7	-2,90	39,20	26,1429	14,62029
PD 8.000 Hz tempo 60	7	-6,30	38,70	25,3571	15,77211
PD 8.000 Hz tempo 70	7	-12,90	38,80	24,1429	18,33829
PD 8.000 Hz tempo 80	7	-19,90	38,90	17,7429	25,47881
PD 8.000 Hz tempo 90	7	-25,50	39,10	15,8143	26,59013

Tabela 11. Valores mínimos para os produtos de distorção em quatro tempos de registro após a injeção de insulina nos grupos controle e estudo nas oito frequências estudadas

Frequência (Hz)	Controle				Estudo			
	60 min	70 min	80 min	90 min	60 min	70 min	80 min	90 min
750	-6,2	-16,5	-19,8	-19,1	-8,2	-6,3	-16,9	-20,0
1.000	-1,6	-4,4	-2,3	0,5	-23,1	-0,1	-9,3	-19,5
1.500	-4,6	-3,7	-7,4	-4,0	-26,6	-21,6	-17,2	-30,2
2.000	-5,5	-0,5	2,2	-1,8	-32,9	-21,9	-22,9	-31,5
3.000	5,2	3,8	5,9	6,1	-25,1	-17,8	-18,7	-34,3
4.000	10,6	8,1	8,4	7,8	-22,7	-27,7	-24,3	-50,5
6.000	23	19,5	21,4	22	-11,8	-14,6	-8,6	-18,3
8.000	18,9	18,4	23,8	25,8	-6,3	-12,9	-19,9	-25,5

Teste binomial para a ocorrência homogênea de valores mínimos entre os grupos controle e estudo ($P < 0,001$).

10. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA

EMISSÕES OTOACÚSTICAS POR PRODUTOS DE DISTORÇÃO DURANTE A HIPERINSULINEMIA AGUDA PROVOCADA EM MODELO ANIMAL

Francisco Carlos Zuma e Maia,* Luiz Lavinsky**

*Programa de Mestrado em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Doutor em Otorrinolaringologia. Professor Adjunto, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

Correspondência:

Dr. Francisco Carlos Zuma e Maia

Rua Ipiranga, 95/602 – Centro

CEP 92010-290 Canoas, RS

Brasil

Fone: +55-51-472-1820

E-mail: zumaemaia@gmail.com

RESUMO

Contexto: A existência de uma nítida relação entre níveis insulinêmicos anormais e a ocorrência de distúrbios labirínticos foi demonstrada em diversos trabalhos. Tais estudos indicam que a hiperinsulinemia é uma das causas mais freqüentes das síndromes cocleovestibulares.

Objetivo: Monitorizar os limiares (dB) das emissões acústicas por produtos de distorção (EOAPD) durante a hiperinsulinemia aguda provocada em um modelo animal, afim de verificar a existência de alterações eletrofisiológicas nas células ciliadas externas da cóclea.

Método: Foram estudadas sete ovelhas no grupo de estudo e sete no grupo controle. Os níveis de insulina e glicose foram dosados simultaneamente ao registro das EOAPD a cada 10 minutos de 0 a 90 minutos. O grupo controle recebeu soro fisiológico e o grupo de estudo recebeu injeção em bolo de insulina humana a uma dose de 0,1 U/kg de peso.

Resultados: O método empregado foi apropriado para promover hipoglicemia e hiperinsulinemia. Não houve modificações nos limiares dos produtos de distorção no grupo controle durante o tempo total do experimento. O grupo de estudo apresentou uma diminuição nos limiares dos produtos de distorção em relação ao grupo controle nas freqüências acima de 1.500 Hz e após 60 minutos ($P < 0,001$).

Conclusão: O estudo das emissões otoacústicas em ovelhas durante a hiperinsulinemia aguda provocada determinou uma modificação eletrofisiológica significativa nas células ciliadas externas da cóclea, demonstrada através da variação dos produtos de distorção em altas freqüências após 60 minutos.

INTRODUÇÃO

A maior prevalência dos distúrbios do metabolismo dos glicídios (DMG) nos indivíduos portadores de problemas cocleovestibulares em relação à população em geral oferece fortes evidências de uma associação entre essas entidades clínicas (1). Dados da literatura estimam que os DMG afetam entre 42 e 80% dos pacientes portadores de zumbido e tontura (2); além disso, muitos estudos mostram que a hiperinsulinemia é uma das causas mais frequentes de síndromes cocleovestibulares (3-11).

Em 1864, Jordão (apud 12) foi o primeiro a relacionar os distúrbios labirínticos com as alterações metabólicas em pacientes com disacusia sensorial e diabetes melito. Na década de 1960, Jorgensen (13) observou alterações histopatológicas na estria vascular de 32 ossos temporais de pacientes diabéticos, enquanto Goldman (14) relatou uma melhora em 90% de seus pacientes com síndrome de Ménière e hipoglicemia com a utilização de extrato adrenocortical associado à dieta. Uma observação semelhante foi feita, mais tarde, por Powers (15). A importância dos níveis de glicose para a produção de adenosina trifosfato, necessária para a manutenção do potencial endococlear da orelha interna, também já foi demonstrada (16-18). D'Avila e Lavinsky (19), que estudaram o perfil glicídico e suas correlações com a doença de Ménière, mostraram que 72% dos pacientes tinham graus variáveis de hiperinsulinemia, detectável nos testes de 5 horas de tolerância à glicose e insulina. Num estudo que incluiu 100 pacientes com sinais clínicos de hipoglicemia e sintomas cocleovestibulares, Lavinsky et al. (3) observaram que a hiperinsulinemia e a hipoglicemia foram os achados mais prevalentes na história clínica, com um valor preditivo positivo de 96% para a ocorrência de distúrbios cocleovestibulares. Outro estudo (7) revelou que 82% dos pacientes com zumbido e história clínica sugestiva de disglucemia apresentavam curvas glicêmicas e hiperinsulinêmicas anormais de 5 horas. Nesses pacientes, a hiperinsulinemia foi o achado mais frequente.

Existem evidências do envolvimento coclear e vestibular mesmo nos estágios iniciais das alterações metabólicas relacionadas à glicose e à insulina (11,19). As pesquisas sobre alterações endococleares com modelos animais revelaram que a orelha interna praticamente não apresenta energia armazenada, e depende do suprimento de oxigênio e da perfusão da glicose para manter o seu intenso nível de atividade. Portanto, as mudanças no metabolismo ou no fluxo sanguíneo têm grande potencial para alterar a homeostase da orelha interna (20), e o estudo dessas alterações podem provavelmente revelar aspectos importantes para explicar a relação entre DMG e os distúrbios da orelha interna.

Na década passada, as emissões otoacústicas evocadas (EOA) foram empregadas em estudos detalhados sobre os aspectos mecânicos da função coclear. Dentre os dois tipos básicos de EOA, transiente e produtos de distorção (PD), este último tipo (EOAPD) é empregado mais comumente na prática clínica, sendo capaz de mostrar alterações cocleares iniciais as quais não são detectadas na audiometria tonal e em outros testes convencionais na doença de Ménière e em outras desordens da orelha interna (21). Entretanto, não existem estudos focalizando a análise das respostas das EOAPD na presença de hiperinsulinemia.

Partindo da hipótese operacional de que a presença dos distúrbios no metabolismo dos carboidratos poderia causar mudanças nas EOAPD, o objetivo do presente estudo foi monitorar essas emissões para avaliar a função das células ciliadas externas (CCE) da cóclea durante a indução aguda de hiperinsulinemia em ovelhas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo experimental foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O estudo seguiu os

princípios internacionais para o manuseio de animais (*Guiding Principles in the Care and Use of Animals*, DHEW Publication, NIH, 80-230).

O cálculo do tamanho da amostra foi determinado com base em um estudo piloto incluindo três animais no grupo de estudo e seis animais no grupo controle. Os critérios de exclusão foram os seguintes: impossibilidade de execução das EOAPD por razões anatômicas do meato acústico externo; deslocamento da sonda da EOA durante o experimento; e morte do animal durante a anestesia. Os animais que conseguiram atingir índices acima de 50% de reprodutibilidade nas EOA transientes, com presença de PD no tempo zero do experimento, foram incluídos no estudo.

Quatorze machos da raça Textel, com peso vivo médio de 40 kg e idade em torno de 18 meses, foram divididos e randomizados em dois grupos (controle ou estudo). Os experimentos não produziram desconforto nos animais, pois eles estiveram sob sedação e anestesia geral. Visto que esse foi um estudo observacional do tipo agudo, os animais não foram sacrificados e retornaram ao seu local de origem logo que possível após o final do experimento.

Indução de hiperinsulinemia aguda e anestesia

No grupo controle (n = 7), após 48 horas de jejum, cada animal recebeu 20 ml de solução salina por via endovenosa. As EOA foram registradas no tempo zero e de 10 em 10 minutos até um total de 90 minutos, simultaneamente à coleta sanguínea para a dosagem de glicose e insulina. No grupo de estudo (n = 7), após 48 horas de jejum, os animais receberam insulina regular por via endovenosa em bolo (0,1 U/kg diluída em 10 ml de solução salina). As EOA foram também registradas no tempo zero e de 10 em 10 minutos até o tempo total de 90 minutos, simultaneamente à coleta sanguínea para a dosagem de glicose e insulina.

Para a sedação, utilizou-se acepromazina 500 mg/kg intramuscular (Univet, São Paulo, Brasil); para a indução anestésica, tiopental 15 mg/kg (Abbott, Rio de Janeiro, Brasil) endovenoso. Para a manutenção, utilizou-se tiopental sódico 600 mg/h em infusão contínua em bomba (B-Braum Nutrimat II, São Gonçalo, RJ, Brasil). Foi realizado bloqueio local na região auricular junto ao trago, usando 75 g de cloridrato de bupivacaína 0,75% (Astra, Cotia, SP, Brasil).

Dez minutos após a pré-medicação, a anestesia era induzida com tiopental e o animal intubado com tubo traqueal nº 8 a 9 acoplado a carro de anestesia com sistema fechado (marca Narcosul, modelo MODULUS 4000, Porto Alegre, RS, Brasil) e fornecimento de oxigênio 100%. Foram monitorados os parâmetros anestésicos de saturação de oxigênio, pulso cardíaco (Oxímetro marca OHMEDA, modelo BIOX 3700e, Louisville, CO, EUA), volume corrente, frequência respiratória (TAKAOKA, modelo VENTICARE, São Paulo, Brasil) e temperatura retal (CONTEMP 400/700 EUA).

Cirurgia para exposição do meato acústico externo

Foi realizada incisão endo-pré-auricular de aproximadamente 2 centímetros com bisturi elétrico (marca Medecir, modelo BMO-870, Medical Cirúrgica, São Paulo, Brasil) após bloqueio local com cloridrato de bupivacaína (0,75%) (Figura 1). O objetivo da incisão foi a melhor visualização do meato acústico externo e da membrana timpânica e colocação da sonda para realização das emissões otoacústicas (Figura 2).

Métodos de registro das OEAs

Durante os registros, a temperatura corpórea de cada animal foi mantida em $37 \pm 0,5$ °C por intermédio do colchão térmico da marca Termway. Os níveis de ruído ambiente durante todo o procedimento não ultrapassaram 65,5 dB (A).

As respostas das EOA transientes foram registradas pelo aparelho da marca Madsen, modelo Capella, acoplado a um *notebook* Toshiba Satellite. Os parâmetros utilizados foram realizados no modo *fast screen*, com estímulo (clique) de 40 μ s e intensidade de 80 dB SPL, com polaridade de condensação. Para a análise dos dados, consideramos somente os segmentos dos registros na janela de 3 a 12,50 ms.

As EOAPD foram registradas pelo mesmo equipamento utilizado para as EOA transientes. Os parâmetros utilizados foram de DP1 = 2F1-F2, com uma relação F1:F2 = 1,22. Os níveis de intensidade foram de F1 = 65 e F2 = 55 dB. Para a análise das EOAPD, utilizamos os limiares de intensidade em dB das frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000 Hz.

Coleta sanguínea de glicose e insulina

Cada animal foi submetido a punção da veia jugular para coleta sanguínea e posterior análise de glicose pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase, com a utilização do kit da LABTEST. A insulina foi medida por imunoenensaio de eletroquimioluminescência (Modular Analytics E170, Roche) em intervalos de 10 minutos até o total de 90 minutos.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 13.0. Para o grupo piloto, foi utilizado o teste t para a comparação entre dois grupos com magnitude do efeito de 2 desvios padrão, com $\alpha = 0,05$ e poder de 90%, dando uma estimativa de 6 animais por grupo. Durante o experimento, o teste binomial foi utilizado para avaliar se a ocorrência de valores mínimos nos limiares (dB) dos produtos de distorção (PD) nas frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000,

6.000 e 8.000 Hz, nos tempos de 60, 70, 80 e 90 minutos foram os mesmos entre os grupos controle e estudo.

RESULTADOS

Todos os animais se comportaram de maneira dócil durante todos os procedimentos pré-operatórios (indução anestésica). Não houve caso de hemorragia, apenas um caso de morte por aspiração pulmonar no grupo controle. A recuperação anestésica total ocorreu em aproximadamente 2 horas, sem incidentes. Em seguida, os animais foram transportados ao seu local de origem, onde foram tomadas as providências para a recuperação da ferida operatória.

O método empregado promoveu a hipoglicemia e hiperinsulinemia desejadas (Figura 3). Não houve modificações nos limiares (dB) dos DP no grupo controle durante os 90 minutos do experimento (Figura 4). A Figura 4 mostra uma diminuição progressiva dos limiares dos DP nas frequências de 750 a 8.000 Hz no grupo estudo.

A Tabela 1 mostra os limiares (dB) mínimos observados para o PD em quatro tempos a partir de 60 min de registro após a injeção de insulina no grupo estudo nas oito frequências (Hz) estudadas. O grupo de estudo apresentou uma ocorrência de eventos mínimos muito maior (28 x 4) de registros de PD, especialmente nas frequências acima de 1.500 Hz ($P < 0,001$; Figura 5). A estimulação utilizada (insulina) não influenciou o número mediano de eventos no grupo controle e de estudo.

DISCUSSÃO

A orelha interna sofre a influência de pequenas variações nos níveis plasmáticos de glicose e insulina pela presença de receptores insulinêmicos no saco endolinfático (22) e transportadores de glicose na estria vascular (23). A hipoglicemia e a presença de altos

níveis de insulina interferem na atividade iônica e energética indispensáveis para o adequado funcionamento dessa estrutura.

O principal objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de modificações eletrofisiológicas nas CCE da cóclea através do estudo das EOAPD após hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal. Para demonstrar a ocorrência de dano nas células ciliadas externas da cóclea durante a hiperinsulinemia aguda, lançamos mão do protocolo de injeção em bolo de 0,1 U/kg de insulina regular, semelhante ao teste de tolerância à insulina (24), onde é avaliada a taxa de redução da glicose ao longo de 15 minutos após a injeção de insulina. Em nosso estudo, foi possível obter uma resposta apropriada para promover hipoglicemia e hiperinsulinemia. As médias dos valores obtidos nas análises das concentrações plasmáticas de glicose e insulina no nosso grupo controle foram as mesmas encontradas na literatura veterinária (25,26) utilizando kits comerciais empregados em humanos.

Revisando a literatura, não encontramos trabalhos experimentais que pudessem ser comparados com o presente estudo, não obstante a importância do tema. Podemos citar apenas um relato de caso clínico (27) descrevendo uma paciente com amenorréia primária e suspeita de hipogonadismo, que foi submetida a hipoglicemia insulínica para investigação. Nessa paciente, as EOA desapareceram na presença de hipoglicemia, fortalecendo a hipótese de que a hipoglicemia altera a funcionalidade da orelha interna.

A utilização da ovelha para propósitos experimentais, inicialmente proposta por Lavinsky e Goycoolea (28) para a pesquisa em otologia, resulta do fato de que este é o animal de escolha em nosso grupo de pesquisa. Os animais atualmente utilizados para o desenvolvimento de pesquisa e treinamento, como cães, gatos e macacos, têm um porte distinto do ser humano e são de difícil manuseio no biotério, por serem agressivos e suscetíveis a doenças. Além disso, muitos são animais de estimação e seu uso para

treinamento e pesquisa pode causar conflitos com sociedades protetoras de animais. Trabalhos prévios do nosso grupo (29-31) revelaram semelhanças significativas entre ovelhas e seres humanos em termos de anatomia, histologia e morfometria da orelha, principalmente em relação ao porte das estruturas. Devido a essas semelhanças, as ovelhas são especialmente adequadas para estudos cirúrgicos e investigações acerca de aspectos otológicos e neurofisiológicos.

No presente estudo, a exposição do meato acústico externo por meio de uma incisão endo-pré-auricular foi de fundamental importância para a visualização da membrana timpânica e para a perfeita adaptação e vedação do meato acústico externo durante o teste das EOA. Isso garantiu registros e resultados consistentes e homogêneos, e possibilitou a realização do primeiro perfil de limiares de EOADP (audiococleograma) em ovelhas (grupo controle).

Inúmeras são as técnicas que podem ser utilizadas para monitorar a função auditiva. As EOA transientes e as EOAPD, que refletem o funcionamento das células ciliadas externas da cóclea, são uma alternativa recente e não-invasiva que vem assumindo importância na identificação de alterações cocleares. Embora as EOA não possam determinar o limiar auditivo, nem substituir a audiometria tonal, a imitanciometria ou a audiometria de tronco encefálico, esses novos exames podem detectar sinais iniciais de dano coclear.

No presente estudo, definimos uma reprodutibilidade acima de 50% nas EOA transientes como parâmetro de inclusão no estudo do tempo zero do experimento de cada animal. A partir desse nível, os achados não são artefactuais, sendo, portanto, confiáveis.

A amplitude das respostas captadas nas EOAPD apresentou uma tendência de crescimento em direção às altas frequências. É possível que a distribuição tonotópica coclear facilite essa maior amplitude em agudos, uma vez que esses estão localizados na

base da cóclea, região proximal ao local de captação das EOA. Gorga et al. (32) sugeriram algumas explicações para as baixas respostas em estímulos de baixa frequência. Uma delas seria a baixa relação sinal/ruído para as frequências graves. Uma segunda explicação seria o modo de transferência da energia pelo sistema da orelha média, que apresenta menor amplificação para graves. Ainda segundo esses autores, essa característica da orelha média interfere na transmissão de graves, tanto na direção da orelha média para a cóclea (estímulo) quanto na direção inversa (resposta). O conjunto desses fatores parece fazer com que as medidas das EOAPD captadas na altura do meato acústico apresentem amplitudes menores em baixas frequências, dificultando a distinção entre as emissões e o ruído de fundo.

O presente estudo permite considerar relevantes os seguintes aspectos:

- Não houve variações nos limiares (dB) dos PD no grupo controle durante os 90 minutos do experimento, mantendo estáveis as características do audiococleograma, que passa a ser o padrão de normalidade em ovelhas.
- O achado de maior relevância nessa pesquisa foi a constatação de que, no grupo de estudo, houve uma diminuição significativa nos limiares de PD em relação ao grupo controle, diminuição esta que foi mais nítida nas frequências > 1.500 Hz e após 60 minutos ($P < 0,001$). Esse dado permite inferir que houve alterações eletrofisiológicas nas CCE da cóclea, principalmente na espira basal da cóclea.

As células ciliadas externas são responsáveis pela amplificação sonora em frequências específicas, um processo chamado “eletromotilidade”, que resulta das mudanças nos fluidos das membranas nessas células. Portanto, é possível que os achados deste estudo estejam refletindo a ação da insulina de forma aguda e elevada e que, após 60

minutos, essa ação comece a ter impacto na eletromotilidade em frequências altas. O trabalho de Horner (33), que provocou hidropisia em cobaias, revelou alterações nas células ciliadas externas da espira apical, enquanto que as da espira basal ficaram preservadas. A teoria formulada pelo autor é a de que isso se deve ao maior tamanho dos estereocílios das células ciliadas externas, que aumentam progressivamente até o ápice. Essa alteração pode ocorrer devido à quebra das pontes interciliares. Um segundo mecanismo que deve ser valorizado para explicar essas alterações é o mecanismo de *feedback* eferente, que pode controlar e proteger seletivamente a espira basal da cóclea, onde termina a maioria das fibras cruzadas mediais. Parece-nos que as alterações nas altas frequências encontradas em nosso estudo decorrem do fato de o estímulo de insulina se dar de forma aguda, o que interferiria na eletrofisiologia celular, porém sem duração suficiente para gerar o processo hidrópico, que é a base do estudo de Horner.

Embora as correlações entre as alterações fisiológicas na cóclea e os DMG sejam difíceis de estabelecer, as EOAPD podem eventualmente se tornar o meio para este fim.

CONCLUSÃO

O estudo de EOAs em ovelhas durante a indução de hiperinsulinemia aguda revelou a ocorrência de mudanças eletrofisiológicas significativas nas CCE da cóclea, evidenciadas pela observação de variações nos limiares de produtos de distorção em frequências elevadas (> 1.500 Hz) após 60 minutos.

REFERÊNCIAS

1. Bittar RSM, Bottino MA, Simoceli L, Venosa AR. Labirintopatia secundária aos distúrbios do metabolismo do açúcar: realidade ou fantasia? *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(6):800-5.
2. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Doenças metabólicas da orelha interna. *RBM-Otorrinolaringologia.* 1995;2(1):18-22.
3. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbidos. *Rev Bras Med.* 2000;7(1):8-12.
4. Updegraff WR. Vertigo in diabetic patients. Presented at the 60th Scientific Meeting of the Neurootological and Equilibrimetric Society. 1979 June 14-16; Turku, Finland.
5. Spencer Jr JT. Hyperlipoproteinemia, hyperinsulinemia and Ménière's disease. *South Med J.* 1981;74:1194-200.
6. Proctor CA. Abnormal insulin levels and vertigo. *Laryngoscope.* 1981;91:1657-62.
7. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.
8. Ganança MM, Caovilla HH, Gananca FF, Serafini F. Dietary management for tinnitus control in patients with hyperinsulinemia. *Int Tinnitus J.* 1995;1(1):41-5.
9. Ramos S. Labirintopatias por distúrbios do metabolismo dos glicídios: evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais com uso de dieta nutricional [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1987.
10. Ramos S, Ramos FR. Síndromes cócleo-vestibulares por distúrbios do metabolismo dos glicídios. Tratamento com dietas nutricionais e evolução dos sintomas e limiares tonais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993;59(2):112-20.

11. Lavinsky L, Oliveira HJC, D'Avila C, Wolf ML. Hyperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J*. 2004;10(1):24-30.
12. Rust KR, Prazma J, Triana RJ, Michaelis OE, Pillsbury HC. Inner ear damage secondary to diabetes mellitus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992;118:397-400.
13. Jorgensen MB. Changes of aging in the inner ear, and the inner ear in diabetes mellitus. Histological studies. *Acta Otolaryngol*. 1963;12(suppl. 188):125-8.
14. Goldman HB. Hypoadrenocorticism and endocrinologic treatment of Meniere's disease. *N Y State J Med*. 1962;62:377-82.
15. Powers WH. Metabolic aspect of Meniere's disease. *Laryngoscope*. 1982;82:1716-25.
16. Koyde Y, Tajima S, Yoshida M, Konno M. Biochemical changes in the inner ear induced by insulin, in relation to the cochlear microphonics. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1960;69:1083-97.
17. Wing KG. The experimental use of hypoglycemia to show whether glucose is a major fuel for the cochlear response, and further remarks concerning the lability of the vascular bed supplying the cochlear partition. *Acta Otolaryngol*. 1959;148:87-93.
18. Mendelson M, Roderique J. Cationic changes in endolymph during hypoglycemia. *Laryngoscope*. 1972;82:1533-40.
19. D'Avila C, Lavinsky L. Glucose and insulin profiles and their correlations in Meniere's disease. In press.
20. Fukuda Y. Glicemia, insulinemia e patologia da orelha interna [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1982.

21. Aquino AMCM, Massaro CAM, Tiradentes JB, Garzón JCV, Oliveira JAA. Emissões otoacústicas no diagnóstico precoce de lesão coclear na doença de Ménière. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2002;68(5):761-6.
22. Knight LC, Saeed SR, Hradek GT, Schindler RA. Insulin receptors on the endolymphatic sac: an autoradiographic study. *Laryngoscope.* 1995;105(6):635-8.
23. Yoshihara T, Satoh M, Yamamura Y, Itoh H, Ishii T. Ultrastructural localization of glucose transporter 1 (GLUT1) in guinea pig stria vascularis and vestibular dark cell areas: an immunogold study. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(3):336-40.
24. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Atheros.* 2002;13(2):42-9.
25. Stumpf W, López J. Efeito da dieta na concentração ruminal de ácido propiônico e níveis plasmáticos de glicose e insulina. In: *Anais da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.* 2000; Viçosa, Brasil.
26. López J, Stumpf J. Influência do grão de sorgo como fonte de amido em ovinos alimentados com feno. Parâmetros plasmáticos. *Rev Bras Zootec.* 2000;29(4):1183-90.
27. Sant'anna GD, Lavinsky L, Schmid H, Zwetsch I. Desaparecimento das emissões otoacústicas durante hipoglicemia insulínica – relato de caso. *Anais da 13ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.* 1993 Nov 8-10; Porto Alegre, Brasil. p. 148.
28. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thomsen J, eds. *Otitis media today.* Copenhagen: Kugler; 1997. p. 1-8.

29. Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança MM, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1999;119:522-7.
30. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico do osso temporal da ovelha com o objetivo da realização de cirurgia experimental e treinamento em cirurgia otológica. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
31. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico da orelha interna através da tomografia computadorizada [tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
32. Gorga MP, Neely ST, Ohlrich B, Hoover B, Redner J, Peters J. From laboratory to clinic: a large scale study of distortion product otoacoustic emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. *Ear Hear*. 1997;18(6):440-55.
33. Horner CK. Hypersensitivity of hydroptic ears, at frequencies with normal thresholds, to temporary threshold shifts. *Hear Res*. 1990;48:281-6.

Tabela 1. Limiares mínimos (dB) para EOAPD em quatro momentos após a injeção de insulina no grupo de estudo e soro fisiológico no grupo controle^a

Frequência (Hz)	Controle				Estudo			
	60 min	70 min	80 min	90 min	60 min	70 min	80 min	90 min
750	-6,2	-16,5	-19,8	-19,1	-8,2	-6,3	-16,9	-20,0
1.000	-1,6	-4,4	-2,3	0,5	-23,1	-0,1	-9,3	-19,5
1.500	-4,6	-3,7	-7,4	-4,0	-26,6	-21,6	-17,2	-30,2
2.000	-5,5	-0,5	2,2	-1,8	-32,9	-21,9	-22,9	-31,5
3.000	5,2	3,8	5,9	6,1	-25,1	-17,8	-18,7	-34,3
4.000	10,6	8,1	8,4	7,8	-22,7	-27,7	-24,3	-50,5
6.000	23	19,5	21,4	22	-11,8	-14,6	-8,6	-18,3
8.000	18,9	18,4	23,8	25,8	-6,3	-12,9	-19,9	-25,5

Teste binomial para a ocorrência homogênea de valores mínimos entre os grupos controle e estudo ($P < 0,001$).

Legendas das figuras

Figura 1. Incisão cirúrgica endo-pré-auricular para melhor visualização do meato acústico externo e membrana timpânica.

Figura 2. Fixação de sonda estável no meado auditivo externo.

Figura 3. A) Média dos níveis de insulina e B) média dos níveis de glicose nos grupos controle e de estudo durante os 90 minutos do experimento.

Figura 4. Média dos níveis de EOAPD durante os 90 minutos do experimento. A) grupo controle; B) grupo de estudo.

Figura 5. Mediana e valores máximos e mínimos para os limiares (dB) entre 750 e 8.000 Hz dos PD no grupo controle e de estudo durante os 90 minutos do experimento. Note a dispersão de valores mínimos em altas frequências (≥ 1.500 Hz) após 60 minutos.



Figura 1



Figura 2

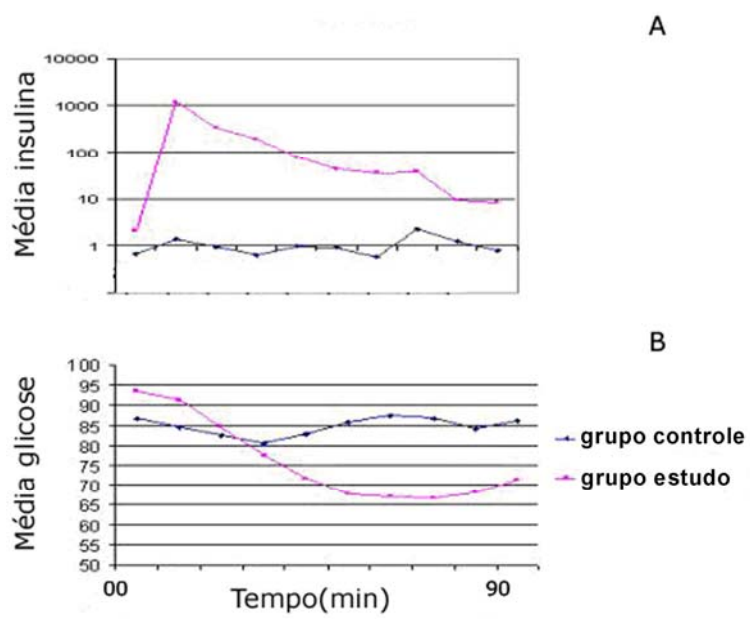


Figura 3

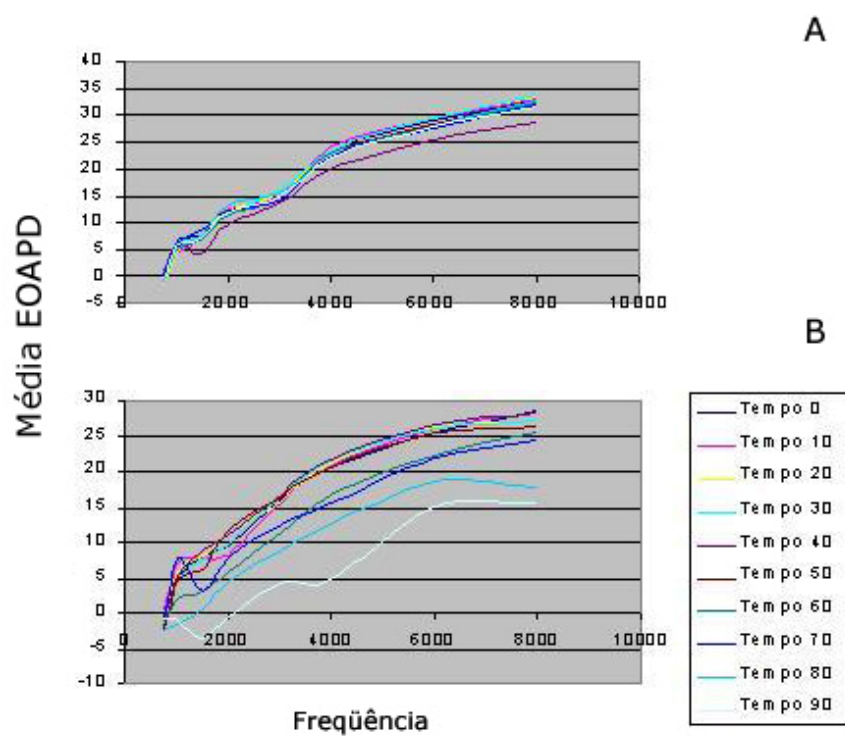


Figura 4

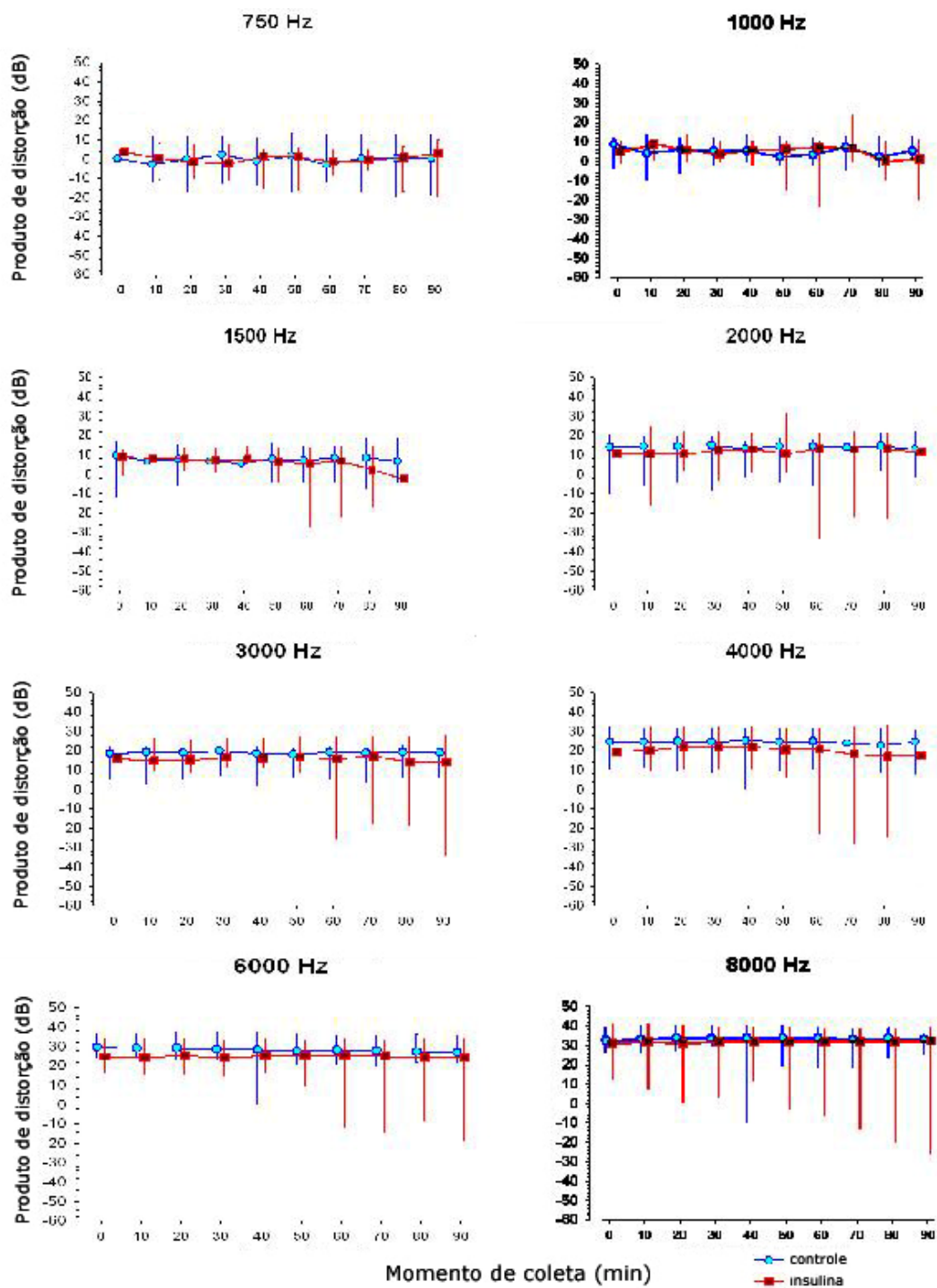


Figura 5

11. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

DISTORTION PRODUCT OTOACOUSTIC EMISSIONS IN AN ANIMAL MODEL OF INDUCED HYPERINSULINEMIA

Francisco Carlos Zuma e Maia,* Luiz Lavinsky**

*Graduate Program In Medicine: Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**PhD, Otorhinolaryngology. Associate Professor, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

This work was carried out at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Center through the Graduate Program in Medicine, Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Correspondence:

Dr. Francisco Carlos Zuma e Maia

Rua Ipiranga, 95/602 – Centro

CEP 92010-290 Canoas, RS

Brazil

Phone: +55-51-472-1820

E-mail: zumaemaia@gmail.com

ABSTRACT

Background: The existence of a clear relationship between abnormal insulin levels and the occurrence of labyrinth disorders has been demonstrated in several works. Among many metabolic alterations, such studies indicate that hyperinsulinemia is one of the most frequent causes of cochleovestibular syndrome.

Objective: Monitor distortion product otoacoustic emission thresholds (dB) during induced acute hyperinsulinemia in an animal model so as to identify the occurrence of electrophysiological changes in cochlear outer hair cell function.

Methods: Two groups of sheep were analyzed. In the study group, seven sheep received a 0.1 U/kg bolus of regular human insulin. In the control group, seven sheep received saline solution. Insulin and glucose levels were measured simultaneously to the recording of distortion product otoacoustic emissions at 10-minute intervals during 90 minutes.

Results: Hypoglycemia and hyperinsulinemia were successfully induced. No changes in distortion product thresholds were detected in the control group during the 90 minutes of the experiment. In the study group, a reduction in distortion product thresholds was recorded in relation to the control group at frequencies above 1,500 Hz and after 60 minutes ($P < 0.001$).

Conclusion: The study of otoacoustic emissions in sheep during induced acute hyperinsulinemia revealed a significant change in cochlear outer hair cell function, made evident by the variation in distortion products in high frequencies after 60 minutes.

INTRODUCTION

The increased prevalence of carbohydrate metabolism disorders (CMD) in individuals presenting cochlear and vestibular dysfunction as compared to the general population provides strong evidence for the existence of an association between these clinical entities (1). Data from the literature indicate that CMDs affect between 42 and 80% of the individuals who suffer from tinnitus and dizziness (2), and many studies show that hyperinsulinemia is one of the most frequent causes of cochleovestibular syndromes (3-11).

In 1864, Jordao was the first to correlate labyrinth disorders with metabolic alterations in a group of patients with sensorial hearing loss and diabetes mellitus (12). In the 1960s, Jorgensen (13) observed histopathological alterations in the *stria vascularis* of 32 temporal bones from diabetic patients, and Goldman (14) reported improvement in 90% of 75 patients with Ménière's syndrome and hypoglycemia with the use of adrenocortical extract associated with a diet. A similar observation was later reported by Powers (15). The importance of glucose levels for the production of adenosine triphosphate, required by the inner ear for maintenance of the cochlear potential has also been demonstrated (16-18). D'Avila and Lavinsky (19), who studied the carbohydrate profile of individuals with Ménière's disease, showed that 72% of the patients had varying degrees of hyperinsulinemia, detectable in 5-hour glucose and insulin tolerance tests. In a study of 100 patients with clinical signs of hypoglycemia and cochleovestibular symptoms, Lavinsky et al. (3) observed that hyperinsulinemia and hypoglycemia were the most prevalent findings, with a 96% positive predictive value for the occurrence of cochleovestibular disorders. Another study (7) found that 82% of the patients with tinnitus and clinical history suggesting dysglycemia had abnormal 5-hour glycemia and insulin curves. Among those patients, hyperinsulinemia was the most frequent finding.

There is evidence of cochlear and vestibular involvement even in early stages of metabolic alterations involving glucose and insulin (11,19). Research with animal models focused on endocochlear alterations have revealed that the inner ear stores practically no energy, and depends on the supply of oxygen and on glucose perfusion to maintain its intense level of activity. Thus, changes in metabolism or blood flow have a great potential to alter inner ear homeostasis (20), and the study of such alterations can probably bring to light important aspects to explain the relationship between CMDs and inner ear disorders.

In the past decade, evoked otoacoustic emissions (EOAE) have been successfully employed for the detailed study of mechanical aspects of cochlear function. Of two basic types of EOAE, transient and distortion product (DP), DP EOAE are more frequently employed in clinical settings since they are capable of showing early cochlear alterations which are not detected by pure tone audiometry and other conventional tests in Ménière and other inner ear disorders (21). However, there have been no studies focusing on DP EOAE measurements in the presence of hyperinsulinemia.

Based on the assumption that the presence of carbohydrate metabolism disorders will cause changes in DP EOAEs, the objective of the present study was to measure these emissions to evaluate cochlear outer hair cell function during induced acute hyperinsulinemia in sheep.

MATERIALS AND METHODS

The present experimental study was carried out in the Animal Facility at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Center. The study followed the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, DHEW Publication, NIH, 80-230.

The sample size was determined based on a pilot study including six animals in a study group and six animals in a control group. The following were exclusion criteria:

impossibility of performing DP EOAE measurements due to the anatomical shape of the external auditory canal; dislocation of the OAE probe during the procedure; and death of the animal during anesthesia. The animals in which we were able to achieve a 50% reproducibility in transient EOAEs and which presented DP at experimental time zero were included in the study.

Fourteen male Textel sheep with mean live weight of 40 kg and 18 months of age were randomly assigned to one of two groups (control or study group). None of the experiments caused any discomfort to the animals, since they were all performed under sedation and general anesthesia. Since this was an acute-type observational study, the animals were not sacrificed and were returned to their place of origin as soon as possible after the end of the experiment.

Induction of acute hyperinsulinemia and anesthesia

In the control group ($n = 7$), after a 48 h fast each animal received 20 ml of endovenous saline infusion. EOAEs were measured at zero and at 10-minute intervals until 90 minutes, simultaneously with the collection of blood samples for glucose and insulin determinations. In the study group, after a 48 h fast the animals received an endovenous insulin bolus (0.1 U/kg diluted in 10 ml saline solution). EOAEs were also measured at zero and at 10-minute intervals until 90 minutes, simultaneously with the collection of blood samples for glucose and insulin determinations.

Sedation was achieved using 500 mg/kg intramuscular acepromazine (Univet, São Paulo, Brazil). For anesthesia induction, 15 mg/kg of endovenous sodium thiopental were used. Maintenance was achieved with continuous pump infusion of 600 mg/hour sodium thiopental (B-Braum Nutrimat II, São Gonçalo, RJ, Brazil). Local block of the auricular

region was performed at the tragus using 75 g of 0.75% bupivacaine chlorhydrate (Astra, Cotia, SP, Brazil).

Ten minutes after premedication, anesthesia was induced by introducing thiopental into an 8 or 9 tracheal tube attached to an anesthesia cart (Narcosul Modulus 4000, Porto Alegre, RS Brazil). 100% oxygen was supplied throughout the procedure. The following parameters were monitored: oxygen saturation, pulse, (oximeter Ohmeda Biox 3700e, Louisville, CO, U.S.A.), current volume, respiratory rate (Takaoka Venticare, São Paulo, Brazil) and rectal temperature (CONTEMP 400/700, USA).

Surgical exposure of the external auditory canal

Following local block with 0.75% bupivacaine chlorhydrate, a surgical incision of approximately 2 cm was performed with an electric scalpel (Medecir BMO-870, Medical Cirúrgica, São Paulo) in the preauricular region (Figure 1). This incision aimed at improving visualization of the external auditory canal and tympanic membrane, as well as placement of a probe to measure EOAE (Figure 2).

Recording of EOAEs

During the recording, the mean body temperature was maintained at 37 ± 0.5 °C using a Termway thermal mattress. Ambient noise level did not exceed 65.5 dBA during the entire procedure.

Transient EOAEs were recorded using a Madsen Capella Cochlear Emission Analyzer attached to a Toshiba Satellite notebook. The parameters were employed in fast-screen mode. The stimulus consisted of a 40 μ s click with an intensity of 80 db peak equivalent SPL and condensation polarity. For data analysis, only the segments recorded in the 3 to 12.50 ms window were considered.

DP EOAEs were recorded using the same equipment described above. The parameters employed were $DP1 = 2F1-F2$ with a ratio of $F1:F2 = 1.22$. F1 and F2 intensity levels were equal to 65 and 55 dB, respectively. The dB thresholds for the 750, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000, 4,000, 6,000 and 8,000 Hz frequencies were employed.

Collection of blood samples for glucose and insulin determinations

A jugular vein puncture was performed for collection of blood samples. An enzymatic colorimetric method (glucose-oxidase) was employed for glucose determination (LABTEST kit). Insulin was determined using an electrochemiluminescence assay (Roche Modular Analytics E170 Analyzer) with measurements performed at 10 minute intervals for a total of 90 minutes.

Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 13.0. The t test for comparison of two groups with an effect size of 2 standard deviations, $\alpha = 0.05$, and power of 90% was used in the pilot study to estimate the sample size as 6 animals per group. During the experiment, the binomial test was employed to compare the minimum DP detection thresholds at 750, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000, 4,000, 6,000 and 8,000 Hz for the study and control groups, at 60, 70, 80 and 90 minutes.

RESULTS

All the animals were docile during preoperative procedures (anesthesia induction). There were no cases of hemorrhage and only one case of death to due aspiration in the control group. Total recovery from anesthesia took approximately two hours and was

uneventful. The animals were returned to their place of origin for recovery from the surgical wound.

Hypoglycemia and hyperinsulinemia were successfully induced (Figure 3). No changes were observed in DP thresholds (dB) in the control group during the 90 study minutes (Figure 4). Figure 4 also shows a progressive dispersion in DP thresholds with time in the study group.

Table 1 shows the minimum thresholds (dB) observed for DP at four different moments starting at 60 minutes after the injection of insulin in the study group in the eight frequencies (Hz) studied. The study group presented a much higher occurrence of minimum DP events than the control group (28 vs. 4), especially in frequencies above 1,500 Hz ($P < 0.001$; Figure 5) and after 60 minutes. Stimulation with insulin did not affect the median number of events in the control and study groups.

DISCUSSION

The inner ear is influenced by small variations in blood glucose and insulin levels due to the presence of insulin receptors in the endolymphatic sac (22) and glucose carriers in the *stria vascularis* (23). Hypoglycemia and high levels of insulin interfere with the ionic and energetic parameters required for the adequate functioning of the inner ear.

The main objective of the present study was to identify the occurrence of electrophysiological alterations in cochlear outer hair cells through the study of DP EOAEs after induced acute hyperinsulinemia in an animal model. To demonstrate the occurrence of damage in the cochlear outer hair cells during acute hyperinsulinemia, we used a 0.1 U/kg bolus injection of insulin, such as that employed in the insulin tolerance test (24) to evaluate the glucose reduction rate in the 15 minute interval following the injection of insulin. In our study, this procedure successfully promoted acute hypoglycemia and

hyperinsulinemia. The mean blood glucose and insulin levels in our control group were similar to those described in other studies with animals (25,26) using a commercial kit also employed in human beings.

Despite the importance of the topic, a literature review did not reveal any experimental works that could be compared to the present study. There was only one case report (27) describing a patient with primary migraine and suspicion of hypogonadism who was submitted to insulin-induced hypoglycemia for diagnostic purposes. In that patient, EOAEs disappeared in the presence of hypoglycemia, which provides evidence for the hypothesis that hypoglycemia does indeed affect inner ear functioning.

The use of sheep for experimental purposes, initially proposed by Lavinsky and Goycoolea (28) for otologic research, results from the fact that this is the animal of choice in our research group. Many of the animals currently employed in research, such as dogs, cats and monkeys are different from human beings in terms of size, and difficult to manage in confined spaces due to their aggressiveness and susceptibility to disease. In addition, these animals are often expensive and hard to obtain. Finally, since some are seen as pets, their use in research and training may cause unwanted conflict with animal protection organizations. Previous works from our group (29-31) have revealed significant similarities between sheep and humans in terms of ear anatomy, histology and morphometry, especially concerning the size of structures. Due to such similarities, sheep are especially useful for surgical studies and investigation of otologic and neurophysiologic aspects.

In the present study, the exposure of the external auditory canal through a preauricular incision was crucial for the visualization of the tympanic membrane and for the perfect adaptation and isolation of the external auditory canal during the EOAEs test, ensuring that cochlear monitoring was free of interference during the entire experiment.

This resulted in consistent and homogeneous EOAE recordings and results, and enabled the performance of the first DP-grams in sheep.

Several techniques are currently employed to monitor auditory function. Transient and DP EOAEs, which reflect the functioning of cochlear outer hair cells, are a recent non-invasive, easy-to use alternative which has been gaining importance. Although EOAEs cannot determine the auditory threshold and do not replace pure tone audiometry, immittance testing or auditory evoked potentials, they are capable of detecting early signs of cochlear damage.

We defined a 50% reproducibility parameter in transient EOAEs as inclusion criterion for the study of experimental time zero for each animal. This reproducibility level rules out artifacts and makes the results reliable.

The amplitude of DP EOAEs showed a tendency toward growth in high frequencies. This larger amplitude in high frequencies could be associated with tonotopic distribution, since high frequencies are located at the basis of the cochlea, proximally to the location where otoacoustic emissions are measured. Gorga et al. (32) suggest some explanations for the reduced response obtained with low frequency stimulation. One would be the low signal to noise ratio for grave tones. A second explanation could be the mode of energy transfer through the middle ear system, which has less amplification capacity for grave tones. According to those authors, this characteristic of the middle ear interferes with the transmission of grave sounds, both from the middle ear to the cochlea (stimulus) and in the opposite direction (response). The sum of these factors seems to result in smaller amplitude in lower frequencies for DP EOAEs measured at the level of the external auditory canal, complicating the distinction between emissions and background noise.

The present study raises the following points:

- There were no threshold changes (dB) in the control group distortion products during the entire experiment (90 minutes). Control DP-grams remained stable during the experimental period, establishing this result as the normality standard in sheep.
- Our most relevant finding was the observation that the study group experienced a significant reduction in DP thresholds when compared to controls, especially in frequencies $> 1,500$ Hz and after 60 minutes ($P < 0.001$). This provides evidence of electrophysiological changes in the outer hair cells, especially in the spiral lamina at the basal turn of the cochlea.

Outer hair cells are responsible for the amplification of sound at specific frequencies, a process known as electromotility, which results from the variation in membrane fluid in these cells. Thus, the present findings are probably reflecting the acute action of insulin, which after 60 minutes starts to influence the electromotility of outer hair cells. The work of Horner (33) has revealed that induced hydrops in guinea pigs led to changes in outer hair cells in the spiral lamina at the apical cochlea, whereas the cells in the spiral lamina at the basal cochlea remained intact. That author proposes that this is due to the size of the cell hair, which increases progressively toward the apex. The changes observed could have resulted from the damage to cell neural connections – the presence of hydrops in the endolymphatic space might force the basal membrane down or the tectorial membrane up, introducing tension and breaking neural connections. A second mechanism that could explain the alterations in outer hair cells is the efferent feedback mechanism that controls and selectively protects the spiral lamina at the basal turn of the cochlea, where most medial fibers end. It seems that the changes observed in high frequencies in the present study result exclusively from the acute nature of the insulin stimulation, which would

interfere with cellular electrophysiology, however without enough time to generate a hydropic process, which is the basis for the study by Horner.

Although correlations between physiological alterations in the cochlea and disturbances in carbohydrate metabolism are difficult to establish, DP EOAEs could eventually become a useful tool for that.

CONCLUSION

The study of EOAEs in sheep during induced acute hyperinsulinemia revealed the occurrence of significant electrophysiological changes in cochlear outer hair cells, made evident through the observed variation in distortion product thresholds at high frequencies (> 1,500Hz) after 60 minutes.

REFERENCES

1. Bittar RSM, Bottino MA, Simoceli L, Venosa AR. Labirintopatia secundária aos distúrbios do metabolismo do açúcar: realidade ou fantasia? *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(6):800-5.
2. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Doenças metabólicas da orelha interna. *RBM-Otorrinolaringologia.* 1995;2(1):18-22.
3. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbidos. *Rev Bras Med.* 2000;7(1):8-12.
4. Updegraff WR. Vertigo in diabetic patients. Presented at the 60th Scientific Meeting of the Neurootological and Equilibrimetric Society. 1979 June 14-16; Turku, Finland.
5. Spencer Jr JT. Hyperlipoproteinemia, hyperinsulinemia and Ménière's disease. *South Med J.* 1981;74:1194-200.
6. Proctor CA. Abnormal insulin levels and vertigo. *Laryngoscope.* 1981;91:1657-62.
7. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.
8. Ganança MM, Caovilla HH, Gananca FF, Serafini F. Dietary management for tinnitus control in patients with hyperinsulinemia. *Int Tinnitus J.* 1995;1(1):41-5.
9. Ramos S. Labirintopatias por distúrbios do metabolismo dos glicídios: evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais com uso de dieta nutricional [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1987.
10. Ramos S, Ramos FR. Síndromes cócleo-vestibulares por distúrbios do metabolismo dos glicídios. Tratamento com dietas nutricionais e evolução dos sintomas e limiares tonais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993;59(2):112-20.

11. Lavinsky L, Oliveira HJC, D'Avila C, Wolf ML. Hiperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J*. 2004;10(1):24-30.
12. Rust KR, Prazma J, Triana RJ, Michaelis OE, Pillsbury HC. Inner ear damage secondary to diabetes mellitus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992;118:397-400.
13. Jorgensen MB. Changes of aging in the inner ear, and the inner ear in diabetes mellitus. Histological studies. *Acta Otolaryngol*. 1963;12(suppl. 188):125-8.
14. Goldman HB. Hypoadrenocorticism and endocrinologic treatment of Meniere's disease. *N Y State J Med*. 1962;62:377-82.
15. Powers WH. Metabolic aspect of Meniere's disease. *Laryngoscope*. 1982;82:1716-25.
16. Koyde Y, Tajima S, Yoshida M, Konno M. Biochemical changes in the inner ear induced by insulin, in relation to the cochlear microphonics. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1960;69:1083-97.
17. Wing KG. The experimental use of hypoglycemia to show whether glucose is a major fuel for the cochlear response, and further remarks concerning the lability of the vascular bed supplying the cochlear partition. *Acta Otolaryngol*. 1959;148:87-93.
18. Mendelson M, Roderique J. Cationic changes in endolymph during hypoglycemia. *Laryngoscope*. 1972;82:1533-40.
19. D'Avila C, Lavinsky L. Glucose and insulin profiles and their correlations in Meniere's disease. In press.
20. Fukuda Y. Glicemia, insulinemia e patologia da orelha interna [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1982.

21. Aquino AMCM, Massaro CAM, Tiradentes JB, Garzón JCV, Oliveira JAA. Emissões otoacústicas no diagnóstico precoce de lesão coclear na doença de Ménière. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2002;68(5):761-6.
22. Knight LC, Saeed SR, Hradek GT, Schindler RA. Insulin receptors on the endolymphatic sac: an autoradiographic study. *Laryngoscope.* 1995.105(6):635-8.
23. Yoshihara T, Satoh M, Yamamura Y, Itoh H, Ishii T. Ultrastructural localization of glucose transporter 1 (GLUT1) in guinea pig stria vascularis and vestibular dark cell areas: an immunogold study. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(3):336-40.
24. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Atheros.* 2002;13(2):42-9.
25. Stumpf W, López J. Efeito da dieta na concentração ruminal de ácido propiônico e níveis plasmáticos de glicose e insulina. In: *Anais da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.* 2000; Viçosa, Brasil.
26. López J, Stumpf J. Influência do grão de sorgo como fonte de amido em ovinos alimentados com feno. Parâmetros plasmáticos. *Rev Bras Zootec.* 2000;29(4):1183-90.
27. Sant'anna GD, Lavinsky L, Schmid H, Zwetsch I. Desaparecimento das emissões otoacústicas durante hipoglicemia insulínica – relato de caso. *Anais da 13ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.* 1993 Nov 8-10; Porto Alegre, Brasil. p. 148.
28. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thomsen J, eds. *Otitis media today.* Copenhagen: Kugler; 1997. p. 1-8.

29. Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança MM, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1999;119:522-7.
30. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico do osso temporal da ovelha com o objetivo da realização de cirurgia experimental e treinamento em cirurgia otológica. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
31. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico da orelha interna através da tomografia computadorizada [tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
32. Gorga MP, Neely ST, Ohlrich B, Hoover B, Redner J, Peters J. From laboratory to clinic: a large scale study of distortion product otoacoustic emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. *Ear Hear*. 1997;18(6):440-55.
33. Horner CK. Hypersensitivity of hydroptic ears, at frequencies with normal thresholds, to temporary threshold shifts. *Hear Res*. 1990;48:281-6.

Table 1. Minimum thresholds (dB) for DP otoacoustic emissions at four moments after injection of insulin in the study group and saline in controls^a

Frequency (Hz)	Control group				Study group			
	60 min	70 min	80 min	90 min	60 min	70 min	80 min	90 min
750	-6.2	-16.5	-19.8	-19.1	-8.2	-6.3	-16.9	-20.0
1,000	-1.6	-4.4	-2.3	0.5	-23.1	-0.1	-9.3	-19.5
1,500	-4.6	-3.7	-7.4	-4.0	-26.6	-21.6	-17.2	-30.2
2,000	-5.5	-0.5	2.2	-1.8	-32.9	-21.9	-22.9	-31.5
3,000	5.2	3.8	5.9	6.1	-25.1	-17.8	-18.7	-34.3
4,000	10.6	8.1	8.4	7.8	-22.7	-27.7	-24.3	-50.5
6,000	23	19.5	21.4	22	-11.8	-14.6	-8.6	-18.3
8,000	18.9	18.4	23.8	25.8	-6.3	-12.9	-19.9	-25.5

^aBinomial test for homogeneous occurrence of minimum values for the study and control

groups: $P < 0.001$

Figure legends

Figure 1. Endo and preauricular surgical incision to improve visualization of the external auditory canal and tympanic membrane.

Figure 2 . Fixation of stable probe in the external auditory canal.

Figure 3. A) Mean insulin levels and B) mean glucose levels in the control and study groups during the 90 study minutes.

Figure 4. Mean DP EOAEs during the 90 study minutes. A) Control group; B) study group.

Figure 5. Median, minimum and maximum thresholds (dB) between 750 and 8,000 Hz for DP in the control group and study group during the 90 study minutes. Note the dispersion of minimum values in high frequencies ($\geq 1,500$ Hz) after 60 minutes.



Figure 1



Figure 2

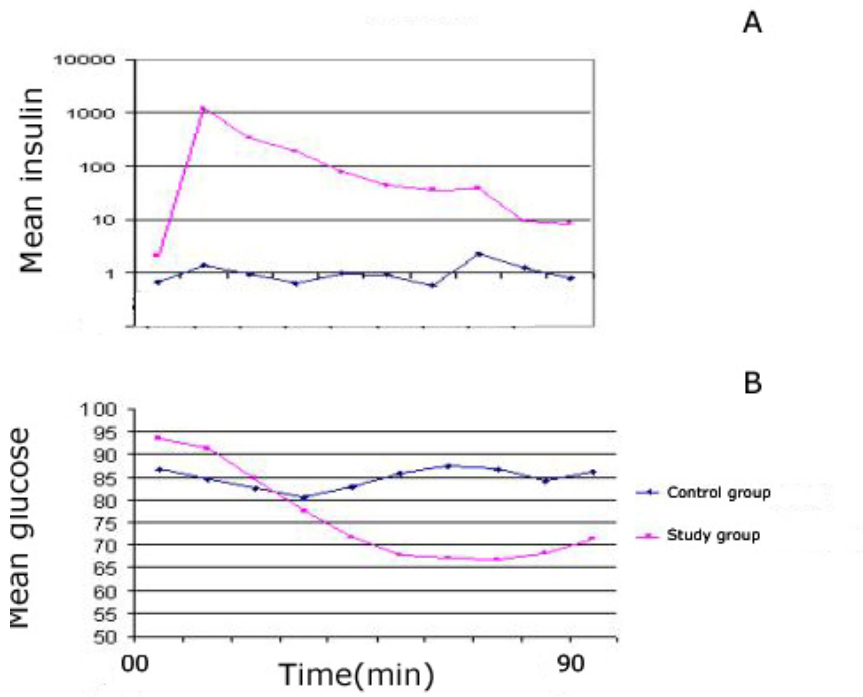


Figure 3

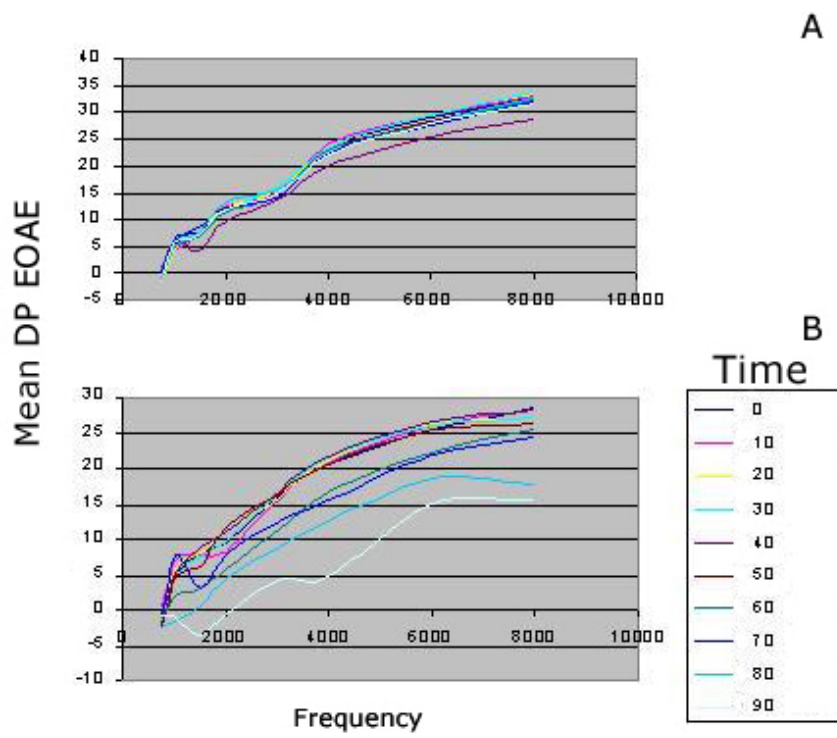


Figure 4

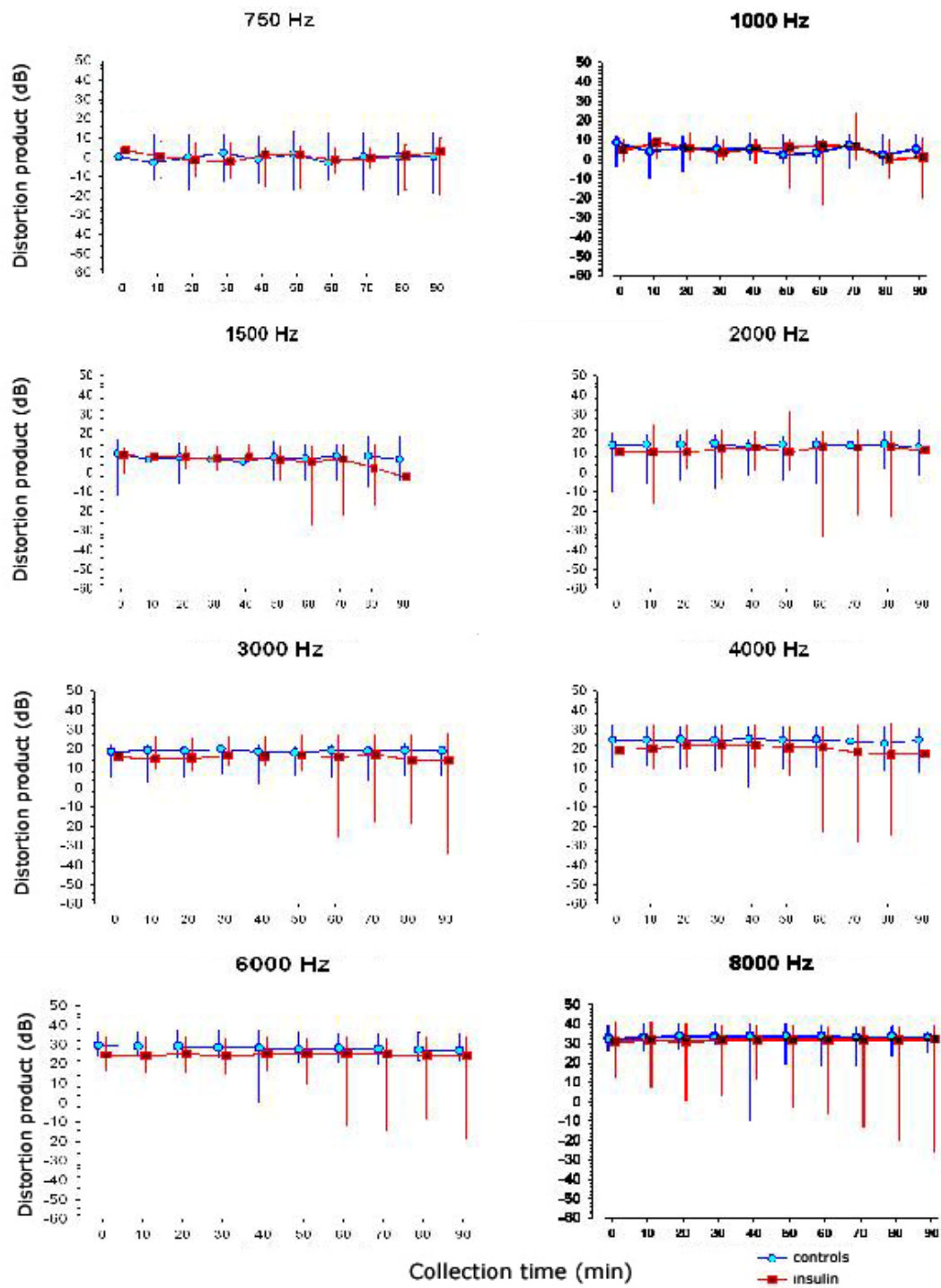


Figure 5