

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia – Otorrinolaringologia

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA ATIVIDADE ELÉTRICA COCLEAR
ATRAVÉS DA ELETROCOCLEOGRAFIA TRANSTIMPÂNICA APÓS
INDUÇÃO DE HIPERINSULINEMIA AGUDA EM MODELO ANIMAL**

Aluno: Roberto Dihl Angeli

Orientador: Prof. Dr. Luiz Lavinsky

Dissertação de Mestrado

2006

Aos queridos Paulo e Carmem, meus amados pais, ainda hoje referenciais de caráter, bondade, honestidade e respeito ao próximo, meu agradecimento por permitirem que eu fosse criado em um ambiente cercado de carinho e amor. Mesmo que se passem 50 ou 60 anos, ainda assim os verei como meu porto seguro.

Para Viviane, Roberta e Helena, co-autoras dos projetos mais importantes da minha vida, a quem ofereço meu amor sem limites.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lavinsky, meu referencial de competência, coerência e ética, agradeço não apenas pela orientação segura no desenvolvimento deste projeto, mas pela confiança que vem depositando em mim há vários anos, permitindo meu crescimento profissional como médico e, agora, como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Alexandre Dolganov, pela surpreendente capacidade de tornar simples o muitas vezes espinhoso universo da eletrofisiologia da audição.

Ao colega Francisco Carlos Zuma e Maia, pelo entusiasmo contagiante e, principalmente, por abrir as portas que tornaram este projeto uma realidade.

À Profa. Roseli de Oliveira Möllerke, que há vários anos vem apoiando, de modo competente, este e outros trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, sempre com a simpatia que lhe é característica.

Ao médico veterinário Marcos Eugênio Soares Duarte, por abraçar este projeto como se fosse seu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, coordenado pelo Prof. Dr. Cléber Dario Pinto Kruehl, por ter me recebido de braços abertos, dando todo o suporte necessário neste período tão importante da minha vida acadêmica.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por ter me acolhido ainda como estudante, médico residente e, finalmente, como pós-graduando. Agradeço de forma particular à Fundação de Amparo à Pesquisa (FIPE), pelo suporte financeiro, ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG), aos funcionários do Setor de Patrimônio e a todos os amigos e colegas do Serviço de Otorrinolaringologia.

Ao Professor Dr. Mário B. Wagner, pela competência que lhe é peculiar.

Ao Centro de Pesquisas do HCPA, de modo especial às Sras. Rosane Schlatter e Fabiana Silva da Silva, pelo fundamental apoio prestado quando este projeto não passava de um sonho distante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo voto de confiança depositado no projeto e neste pesquisador.

À sociedade brasileira, que, compulsoriamente, através do suor do seu trabalho, fornece os recursos que permitem que este e outros projetos de pesquisa sejam realizados.

A todos que, de alguma forma, prestaram a sua contribuição, mesmo que pequena, na concretização deste projeto, presto meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1. Da eletrofisiologia coclear.....	17
3.2. Do metabolismo coclear	19
3.3. Do ciclo do potássio	22
3.4. Do hiperinsulinismo e suas repercussões na orelha interna	23
3.5. Da ECoG em situações normais e patológicas	30
3.6. Da ovelha como animal de experimentação	32
4. MATERIAL E MÉTODO	34
4.1. Características da amostra	34
4.2. Intervenção	34
4.3. Anestesia.....	35
4.4. Exposição da membrana timpânica	36
4.5. Coleta sanguínea de glicose e insulina	37
4.6. Registro dos potenciais evocados auditivos	38
5. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	40
6. RESULTADOS	41

7. DISCUSSÃO	46
8. REFERÊNCIAS	54
9. ANEXO	63
10. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA	70
11. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo celular da estria vascular, demonstrando o sistema de secreção ativa de potássio na endolinfa a partir das células estriais marginais. Adaptado de Marcus et al. (36).	22
Figura 2. Aspecto final do animal após anestesia e intubação orotraqueal.	36
Figura 3. Incisão cirúrgica endo-pré-auricular para visualização da membrana timpânica.	37
Figura 4. Otocone adaptado ao conduto auditivo externo.	37
Figura 5. Interface do <i>software</i> Clampfit 9.2.	38
Figura 6. Média da insulinemia nos grupos intervenção e controle durante 90 minutos.	41
Figura 7. Média da glicemia nos grupos intervenção e controle durante 90 minutos.	42
Figura 8. Traçados eletrococleográficos obtidos nos animais 1, 2 e 3 (grupo intervenção).	43
Figura 9. Traçados eletrococleográficos obtidos nos animais 4, 5 e 6 (grupo controle).	44
Figura 10. Médias observadas nos grupos intervenção e controle para a razão (<i>fold</i>) do potencial de ação coclear em relação ao momento basal e aos níveis de glicemia.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos fluidos cocleares. Adaptado de Wangemann e Schacht (21).	18
Tabela 2. Padrões normais e patológicos de insulinemia.	26
Tabela 3. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 1 (grupo intervenção) nos minutos 0 a 90.	63
Tabela 4. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 2 (grupo intervenção) nos minutos 0 a 90.	64
Tabela 5. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 3 (grupo intervenção) nos minutos 0 a 90.	65
Tabela 6. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 4 (grupo controle) nos minutos 0 a 90.	66
Tabela 7. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 5 (grupo controle) nos minutos 0 a 90.	67
Tabela 8. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 6 (grupo controle) nos minutos 0 a 90.	68
Tabela 9. Valores médios de glicemia, insulinemia e amplitude do potencial de ação neural nos grupos controle e intervenção.	69

ABREVIATURAS

(Na⁺/K⁺)-ATPase = sódio-potássio ATPase

ABR = *auditory brainstem response audiometry* ou audiometria de tronco cerebral

ADP = difosfato de adenosina

ANOVA = análise de variância

ATP = trifosfato de adenosina

BBC = *broad band click* ou clique de banda larga

dBNPS = nível de pressão sonora em decibéis

dL = decilitro

DM = diabetes melito

DMNID = diabetes melito não-insulino-dependente

ECoG = eletrococleografia

EOAPD = otoemissões acústicas por produtos de distorção

GH = *growth hormone* ou hormônio do crescimento

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Hz = hertz

IG = índice glicêmico

kg = quilograma

kHz = quilohertz

LCR = líquido cefalorraquidiano

MC = microfonismo coclear

mEq/L = miliequivalentes por litro

mg = miligrama

mg/kg = miligramas por quilograma de peso

mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimoles

ms = milissegundo

mU/L = miliunidades por litro

mV = milivolts

PA = potencial de ação

PEATE = potencial evocado auditivo de tronco cerebral

PS = potencial de somação

SPSS = Statistical Package for the Social Sciences

TDG = tolerância diminuída à glicose

U/kg = unidades por quilograma de peso

RESUMO

Introdução: Vários estudos têm demonstrado, sob os pontos de vista clínico e experimental, a influência do metabolismo dos hidratos de carbono sobre a função da orelha interna. Muitos desses estudos apontam a hiperinsulinemia como o fator etiológico mais freqüentemente associado a patologias tanto cocleares como vestibulares.

Objetivo: Registrar e analisar as alterações na atividade elétrica coclear, através da eletrococleografia (ECoG) transtimpânica, durante o hiperinsulinismo induzido em um modelo animal.

Materiais e método: Seis ovelhas macho adultas foram divididas em dois grupos de igual tamanho; após anestesia venosa, os animais foram submetidos ao exame de EcoG e à coleta de sangue periférico para determinação de glicemia e insulinemia. No grupo intervenção, foi administrada insulina regular humana (0,1 U/kg). O grupo controle recebeu somente solução fisiológica. A glicemia e a insulinemia foram determinadas simultaneamente ao registro da atividade elétrica coclear a cada intervalo de 10 minutos, por 90 minutos.

Resultados: No grupo submetido à intervenção, houve progressiva redução na amplitude do potencial de ação coclear em relação ao grupo controle ($p = 0,001$).

Discussão: Os resultados podem ser atribuídos à supressão da atividade da enzima (Na^+/K^+) -ATPase na estria vascular. Esse fenômeno compromete a manutenção do potencial endococlear e a posterior despolarização das células ciliadas cocleares assim como das fibras que compõem a porção auditiva do VIII par craniano.

ABSTRACT

Introduction: Several different studies have demonstrated the influence of carbohydrate metabolism on inner ear function, from both clinical and experimental perspectives. Many of these studies have identified hyperinsulinemia as the most frequent etiologic factor associated with both cochlear and vestibular pathologies.

Objective: To record and analyze alterations in cochlear electrical activity in an animal model during induced hyperinsulinemia, using transtympanic electrocochleography (ECoG).

Methods: Six adult male sheep were divided into two equal groups and, after venous anesthesia, were subjected to ECoG examination and peripheral blood testing for glycemia and insulinemia assay. Regular human insulin IV was administered (0.1 U/kg) to the animals in the intervention group. The control group received saline solution only. Glycemia and insulinemia were assayed simultaneously with cochlear electrical activity recording, every 10 minutes, for 90 minutes.

Results: There was a progressive reduction in the amplitude of cochlear action potential in the intervention group in relation to the control group ($p = 0.001$).

Discussion: These results could be attributed to suppression of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ enzyme activity in the stria vascularis. This phenomenon leads to loss of endocochlear potential and subsequent depolarization of cochlear hair cells and also of the fibers that make up the auditory portion of the VIII cranial nerve pair.

1. INTRODUÇÃO

A orelha interna se caracteriza por um sistema de cavidades preenchido pelos fluidos labirínticos. Enquanto a **perilinf**a apresenta características extracelulares, a **endolinf**a apresenta uma composição iônica tipicamente intracelular, com alta concentração de potássio e muito pouco sódio (1). A diferente composição eletrolítica entre endolinf a e perilinf a gera, na cóclea, um gradiente elétrico de aproximadamente +85 milivolts (mV), denominado **potencial endococlear** (2).

A despolarização das células ciliadas cocleares ocorre a partir da entrada do potássio endolinfático por canais iônicos localizados na sua superfície apical e pela concomitante queda do potencial endococlear (3). Esse processo promove a progressão do estímulo acústico e a posterior despolarização das fibras que compõem a porção auditiva do VIII par craniano.

Essas alterações de voltagem têm um padrão reconhecido, e seu registro é útil em uma série de situações clínicas na área da otoneurologia. A **eletrococleografia** (ECoG) é o método que registra essas variações de potenciais elétricos (4).

As alterações no metabolismo dos carboidratos têm sido consideradas um dos fatores etiológicos mais prevalentes em uma série de distúrbios cocleovestibulares (5,6). As formas mais estudadas dessas dismetabolopatias são a **tolerância diminuída à glicose** (TDG) e o **diabetes melito não-insulino dependente** (DMNID). Essas entidades clínicas têm na resistência periférica à insulina e, conseqüentemente, no hiperinsulinismo o seu denominador comum (7).

Alguns autores têm identificado a **hiperinsulinemia isolada** ou com **euglicemia** como uma etapa ainda mais precoce à TDG nesse verdadeiro *continuum* patológico,

motivo pelo qual essa condição é denominada de diabetes melito (DM) oculto ou *in situ* (8,9). Alguns indivíduos podem apresentar, nessa etapa, hipoglicemia reacional (10).

Considerando as peculiaridades no metabolismo energético da orelha interna, o hiperinsulinismo isolado ou associado à hipoglicemia pode apresentar comprometimento exclusivo do labirinto (10).

A orelha interna possui intensa atividade metabólica e pouca reserva de energia armazenada, dependendo de suprimento constante de oxigênio e glicose (11,12). O potencial endococlear é gerado e mantido pela estria vascular a partir da excreção ativa de potássio na endolinfa (13). A excessiva concentração de insulina no sangue periférico bloqueia a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria (14,15), removendo o potássio da endolinfa, retendo sódio e, conseqüentemente, aumentando a pressão osmótica nesse nível, resultando em hidropisia endolinfática (10). Esse desequilíbrio iônico também compromete a manutenção do potencial endococlear e a conseqüente transmissão do estímulo acústico.

A partir dessas considerações, uma série de estudos que investigou o metabolismo sistêmico de pacientes com distúrbios labirínticos identificou o hiperinsulinismo como a alteração mais freqüentemente encontrada (16-19).

Por outro lado, a falta de parâmetros objetivos de mensuração e a impossibilidade de se observarem modificações histopatológicas *in vivo* são reconhecidas, por alguns autores, como motivos de discordância em relação ao real impacto dos distúrbios metabólicos no sistema cocleovestibular (20). Desta forma, o presente estudo propõe, dentro da linha de pesquisa experimental de estudo das dismetabolopatias da orelha interna desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Otologia e Otoneurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), registrar e interpretar as alterações na atividade elétrica coclear, através da ECoG transtimpânica, após indução aguda de hiperinsulinemia em um modelo animal, visando identificar o papel dessas dismetabolopatias na atividade funcional da

cóclea e melhor conhecer as correlações dessa disfunção com os danos que ocorrem na mesma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral: Registrar, analisar e interpretar, através da EcoG transtimpânica, a atividade elétrica coclear antes e imediatamente após a indução aguda de hiperinsulinemia em um modelo animal.

2.2. Objetivo específico: Avaliar a repercussão do estado provocado de hiperinsulinismo agudo na audição.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Da eletrofisiologia coclear

A orelha interna, ou **labirinto**, caracteriza-se por um complexo sistema de cavidades situado na porção petrosa do osso temporal. O labirinto anterior contém a cóclea (do grego *kokhlias* = caracol), enquanto o labirinto posterior é formado pelo sistema vestibular: sáculo, utrículo e canais semicirculares.

Um delicado sistema de membranas divide a cóclea em três câmaras: as duas mais externas, denominadas rampas timpânica e vestibular, compõem o labirinto ósseo e são preenchidas por perilinfa; entre essas duas situa-se uma terceira câmara, o ducto coclear (ou escala média), representando o labirinto membranoso, preenchida por endolinfa e que alberga os receptores auditivos periféricos.

A perilinfa apresenta uma composição iônica de características extracelulares, assim como o plasma ou o líquido cefalorraquidiano (LCR). Já a endolinfa apresenta uma composição iônica única, pois trata-se de um fluido extracelular com características tipicamente intracelulares, tendo o potássio como principal cátion e muito baixa concentração de sódio. As concentrações iônicas aproximadas dos fluidos cocleares estão descritas na Tabela 1 (21).

A composição iônica dos fluidos cocleares foi pioneiramente descrita por Smith et al. em 1954. À luz do conhecimento da época, esses autores afirmaram que “não está óbvio o significado deste modelo eletrolítico incomum” (1).

Tabela 1. Composição dos fluidos cocleares. Adaptado de Wangemann e Schacht (21).

	<i>Perilinfã (RT)</i>	<i>Perilinfã (RV)</i>	<i>Endolinfã</i>	<i>LCR</i>
Sódio (mM)	148	141	1,3	149
Potássio (mM)	4,2	6,0	157	3,1
Cloro (mM)	119	121	132	129
Bicarbonato (mM)	21	18	31	19
Cálcio (mM)	1,3	0,6	0,023	-
Proteínas (mg/dL)	178	242	38	24
Potencial (mV)	0	<3	85	0

RT = rampa timpânica; RV = rampa vestibular; LCR = líquido cefalorraquidiano.

Na cóclea, a diferente composição iônica entre perilinfã e endolinfã leva à geração de um gradiente elétrico de cerca de +85 mV, denominado **potencial endococlear**, uma vez que não ocorre no labirinto vestibular (2). Em 1958, Tasaki e Spyropoulos demonstraram experimentalmente que o potencial endococlear é gerado na estria vascular, epitélio altamente vascularizado que forma a parede lateral do ducto coclear (13).

O estímulo acústico é transmitido à orelha interna através de movimentos vibratórios exercidos pela platina do estribo e pela janela oval à perilinfã da rampa timpânica. Essa onda hidroacústica desencadeia um movimento correspondente na membrana basilar que, por sua vez, deforma os estereocílios das células ciliadas externas, que estão em contato com a membrana tectorial. Os canais iônicos na face endolinfática da célula se abrem, e uma grande quantidade de cálcio e, principalmente, potássio entra no corpo da célula, causando sua despolarização e posterior encurtamento dos estereocílios, o que acaba por tracionar a membrana tectorial em direção aos cílios mais longos das células ciliadas internas, que normalmente não a alcançam (3,22). Esse movimento deflete o feixe

estereociliar das células ciliadas internas, levando à abertura dos canais iônicos, à entrada de cálcio e potássio endolinfático para o seu interior e à consequente despolarização celular.

Através da repetição desse ciclo de despolarização e repolarização celular ocorre a geração e a transmissão do estímulo elétrico pelas terminações neuronais na cóclea e pelo nervo auditivo em direção ao tronco cerebral. Desta forma, a despolarização das células ciliadas cocleares e a transmissão do estímulo acústico pela cóclea e pelo nervo auditivo dependem integralmente das concentrações iônicas na endolinfa e da manutenção do potencial endococlear (2,21).

O suprimento arterial para o labirinto membranoso é realizado através da artéria auditiva interna (ou artéria labiríntica), ramo da artéria cerebelar ântero-inferior – a qual, por sua vez, é ramo da artéria basilar. A artéria auditiva interna trafega pelo canal auditivo interno para então dividir-se em três ramos: a artéria vestibular nutre o nervo vestibular, partes do sáculo e do utrículo e os canais semicirculares; a artéria cocleovestibular nutre o giro basal da cóclea, o sáculo, o utrículo e partes dos canais semicirculares; a artéria coclear nutre a cóclea através das artérias espirais. Esse sistema arterial é tênue e não apresenta circulação colateral (22).

O suprimento arterial coclear apresenta um efetivo mecanismo regulador do fluxo através do sistema nervoso autônomo, capaz de alterar o diâmetro vascular por meio de contrações das células musculares lisas na parede do vaso (23).

3.2. Do metabolismo coclear

Metabolismo pode ser entendido como o conjunto de processos bioquímicos que possibilita a sobrevivência e a função celular. Uma grande parcela desses processos se destina à produção de energia a partir da digestão dos alimentos. Os mecanismos

fisiológicos que necessitam de energia para operar obtêm-na do trifosfato de adenosina (ATP), uma combinação de adenina, ribose e três radicais fosfato. A remoção desses radicais libera a energia empregada nos processos fisiológicos celulares.

A glicose é o principal produto do processo de digestão dos carboidratos. A partir da sua degradação no citoplasma celular há a formação de novas moléculas de ATP, que ficam, então, disponíveis para utilização nos processos celulares. A insulina é um hormônio polipeptídeo produzido nas células beta do pâncreas e, entre outras funções em nível celular, atua como um facilitador do transporte da glicose para dentro da célula e regula o transporte iônico através da membrana celular.

O glicogênio é a forma de depósito da glicose e encontra-se principalmente no fígado e, em menor quantidade, no músculo esquelético. A degradação do glicogênio fornece novamente a glicose necessária para o metabolismo celular.

As **ATPases** são um grupo de enzimas que catalisam o ATP em ADP (difosfato de adenosina) e em fosfato livre, liberando energia. As **ATPases de membrana** constituem um importante subgrupo, sendo responsáveis pelo fornecimento da energia necessária ao transporte de moléculas através da membrana celular. Entre essas ATPases de membrana está a sódio-potássio ATPase, ou $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$, que estabelece o equilíbrio iônico intra e extracelular, mantendo o potencial elétrico celular.

A estria vascular é a estrutura responsável pela geração e manutenção do potencial endococlear (13,21). Em 1969, Kuijpers e Bonting descreveram a elevada atividade da enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria, sugerindo que essa estrutura tenha uma elevada atividade metabólica e que a manutenção do potencial ocorra através de um alto gasto energético (11).

Depósitos de glicogênio já foram descritos na estria vascular (24,25). Entretanto, a estria não os utiliza como fonte de glicose em condições normais (25), mas o faz,

excepcionalmente, em situações de hipóxia (26). Assim, conclui-se que a atividade da enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e a manutenção do potencial endococlear são fortemente dependentes de um aporte constante de glicose pelo sistema arterial (12,27).

Já foi demonstrado que a indução de isquemia na cóclea reduz sensivelmente os níveis de ATP, glicose e glicogênio no ducto coclear (25). Também observou-se experimentalmente que a instalação de isquemia acarreta imediata – porém transitória – queda no potencial endococlear (27).

Enquanto a ação da glicose na cóclea envolve a formação de novas moléculas de ATP, a ação da insulina ainda é controversa. Receptores específicos já foram identificados no órgão de Corti, na estria vascular e no saco endolinfático (28). O efeito mais estudado da insulina, a saber a facilitação da entrada de glicose para dentro da célula, não ocorre na estria vascular (29). Alguns autores sugerem que uma alta concentração de insulina plasmática possa levar ao bloqueio da ação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria (14,15), alterando as concentrações iônicas tanto da perilinfá como da endolinfá e comprometendo a manutenção do potencial endococlear.

Além dos mecanismos descritos, outros tantos parecem interferir na função das ATPases de membrana e, por conseqüência, no transporte iônico celular da cóclea. Já foi demonstrado experimentalmente que a indução de hipotireoidismo pode diminuir a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria vascular (30). O mesmo efeito foi observado em ratos submetidos a adrenalectomia bilateral (31). Estudos que avaliaram a ação das catecolaminas nessa atividade enzimática identificaram significativa redução após a administração intraperitonal de reserpina e dopamina (32,33), demonstrando que o equilíbrio iônico coclear é resultado de uma complexa integração fisiológica.

3.3. Do ciclo do potássio

Através do emprego de radioisótopos, foi demonstrado que o potássio endolinfático provém da perilinfa, e não do sangue periférico (34). Estudos posteriores demonstraram que o potássio apresenta um ciclo contínuo de absorção e liberação celular dentro da orelha interna (2). Nesse modelo, o potássio endolinfático entra nas células ciliadas por canais situados na sua superfície apical e sai em direção à perilinfa por canais específicos, sendo o KCNQ4 o mais importante. O potássio perilinfático é, então, absorvido por fibrócitos do ligamento espiral e transportado para células estriais intermediárias e, a partir daí, para o espaço interestrial através do canal iônico KCNJ10, como demonstrado na Figura 1. A partir do espaço interestrial, o potássio é absorvido através da membrana basolateral das células estriais marginais, sendo secretado na endolinfa através da membrana apical pelos canais KCNQ1 e KCNE1, concluindo o ciclo coclear (35).

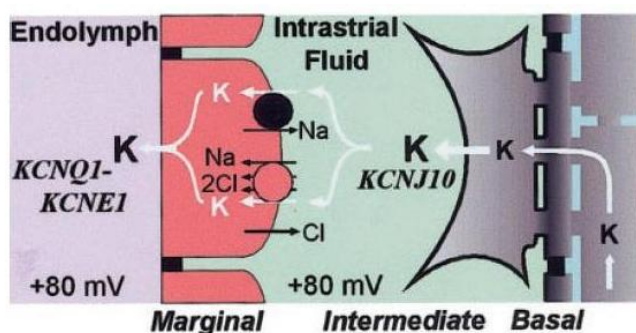


Figura 1. Modelo celular da estria vascular, demonstrando o sistema de secreção ativa de potássio na endolinfa a partir das células estriais marginais. Adaptado de Marcus et al. (36).

O canal iônico KCNJ10 é considerado o efetivo gerador do potencial endococlear, e seu gene é expresso apenas nas células intermediárias da estria vascular. Já foi determinado

experimentalmente que a supressão desse gene leva à abolição do potencial endococlear (36).

A importância do metabolismo do potássio na manutenção da atividade coclear pode ser ilustrada em duas situações:

- **Síndrome de Jervell e Lange-Nielsen.** Rara doença genética caracterizada por surdez profunda ao nascimento e alterações na condução elétrica no músculo cardíaco. Quando não tratada, pode haver comprometimento da função cardíaca, arritmias ou mesmo morte súbita. A etiologia é uma mutação nos genes *KCNQ1* e *KCNE1*, cujas proteínas atuam em conjunto na formação de canais de potássio encontrados exclusivamente no músculo cardíaco e na estria vascular (37).
- **Síndrome de Pendred.** Caracterizada por surdez profunda ao nascimento e bócio. Decorre de uma mutação no gene *SLC26A4*, que codifica a proteína pendrina, implicada no transporte de iodeto. A falta dessa proteína leva à perda da expressão do gene que codifica o canal iônico *KCNJ10*, abolindo o potencial endococlear (38).

3.4. Do hiperinsulinismo e suas repercussões na orelha interna

As dismetabolopatias dos carboidratos incluem uma ampla gama de manifestações metabólicas, cada qual com suas particularidades de apresentação, diagnóstico e manejo, embora possam ser consideradas estágios diferentes de um mesmo processo fisiopatogênico. Essa diversidade de manifestações configura, então, um verdadeiro *continuum* de alterações nos mecanismos de utilização e metabolização dos carboidratos (39).

Dentre essas alterações, reconhecemos três diferentes entidades clínicas que apresentam, como denominador comum, a resistência periférica à ação da insulina e, conseqüentemente, o hiperinsulinismo (7):

- Hiperinsulinismo isolado (ou com euglicemia);
- Tolerância diminuída à glicose (TDG);
- Diabetes melito não-insulino-dependente (DMNID).

Tanto o DMNID como a TDG representam formas hiperglicêmicas dessas dismetabolopatias. A TDG representa uma etapa anterior ao DMNID, podendo precedê-lo por vários anos (7,9). Essas formas de alteração metabólica levam ao comprometimento da orelha interna através de dois mecanismos principais, que agem de forma isolada ou associada:

- Neuropatia do VIII par craniano, secundária à atrofia dos neurônios do gânglio espiral e, principalmente, a um progressivo processo de desmielinização neural (40);
- Microangiopatia diabética, caracterizada por proliferação epitelial e espessamento da membrana basal de capilares e pequenos vasos sanguíneos, especialmente na estria vascular (41).

O primeiro relato da associação entre DM e perda auditiva foi feito por Abel Jordão em 1864 (42). Entretanto, apenas em 1963 foram descritas as alterações histopatológicas cocleares secundárias ao DM (43). Desde então, vários outros estudos clínicos ou histopatológicos confirmaram essa associação, apesar de haver controvérsias a respeito da real intensidade de seu impacto (44,45).

Segundo o modelo do *continuum* de alterações metabólicas, o hiperinsulinismo sem hiperglicemia representa uma etapa mais precoce, podendo preceder por vários anos o aparecimento da TDG. Por isso, essa condição recebe a denominação de DM oculto ou DM *in situ* (8).

Esses estados hiperinsulinêmicos são, teoricamente, uma forma mais tênue de alteração do metabolismo dos carboidratos. Entretanto, as repercussões na função da orelha interna podem ser as mesmas observadas em pacientes com DMNID ou TDG, devido às características iônicas e metabólicas observadas, de modo especial, na estria vascular (10).

Os testes convencionais tradicionalmente empregados no diagnóstico das alterações do metabolismo dos carboidratos, por considerarem apenas as dosagens de glicemia, freqüentemente resultam normais ou apenas levemente alterados nesses indivíduos. As dosagens concomitantes de insulina plasmática aumentam a sensibilidade diagnóstica e se tornam, desta forma, imprescindíveis na etapa de investigação laboratorial (5,46).

O diagnóstico é realizado através da curva glico-insulinêmica de 5 horas com sobrecarga oral de 100 gramas de glicose. A glicose representa o estímulo mais importante, que aciona tanto a liberação como a síntese da insulina pelas células beta-pancreáticas, enquanto outros agentes, como hormônios intestinais e certos aminoácidos (leucina e arginina) estimulam apenas a sua liberação (47).

Os padrões de anormalidade nas curvas de insulina plasmática foram propostos por Kraft a partir da avaliação de 3.650 indivíduos submetidos a sobrecarga oral de glicose (8). Estes parâmetros são empregados até a atualidade (Tabela 2).

Tabela 2. Padrões normais e patológicos de insulinemia.

Tipo I – Normal

1. Valor em jejum: 0 a 25 mU/L
2. Pico entre 30 e 60 minutos (não importa o valor do pico)
3. Valor em 120 minutos até 50 mU/L
4. Soma dos valores de 120 a 180 minutos até 60 mU/L
5. Valores entre 240 e 300 minutos na faixa do jejum

Tipo II – Pico normal, retorno lento

II₁ – Pico entre 30 e 60 minutos, soma dos valores de 120 e 180 minutos acima de 60 e abaixo de 100 mU/L – limítrofe

II₂ – Pico entre 30 e 60 minutos, soma dos valores de 120 e 180 minutos acima de 100 mU/L – anormal

Tipo III_A – Pico em 120 minutos**Tipo III_B – Pico em 180 minutos****Tipo IV – Valor em jejum maior que 50 mU/L****Tipo V – Curva insulinopênica – todos os valores menores que 50 mU/L**

Ao causar hipoglicemia, o hiperinsulinismo compromete a formação de novas moléculas de ATP, diminuindo a quantidade de energia livre para assegurar a manutenção do metabolismo celular na orelha interna.

Níveis elevados de insulina também acarretam o bloqueio da atividade da enzima (Na⁺/K⁺)-ATPase na estria vascular, comprometendo o transporte iônico através da membrana celular (11,14) e, conseqüentemente, o potencial endococlear. A retenção de sódio na endolinfa também aumenta a pressão osmótica nesse nível, favorecendo o aparecimento da hidropisia endolinfática (10).

Os efeitos do hiperinsulinismo nas concentrações iônicas dos fluidos cocleares foram demonstrados experimentalmente em roedores em um estudo no qual a indução de hipoglicemia através da administração de insulina acarretou significativa queda nos níveis de potássio (147,8 mEq/L para 57,1 mEq/L) e concomitante acúmulo de sódio (5,8 mEq/L para 96,4 mEq/L) na endolinfa (48).

Em outro estudo, a indução de hipoglicemia em *guinea pigs* através da administração de insulina levou a importante supressão do microfonismo coclear (MC), que corresponde às modificações de voltagem decorrentes da entrada de potássio endolinfático nas células ciliadas cocleares. Os autores consideraram curioso que, ao administrar glicose aos animais, o MC era recuperado apenas de forma parcial, o que levou à hipótese de que o hiperinsulinismo poderia apresentar efeito comprometedor na captação de oxigênio pelas células ciliadas independentemente da indução de hipoglicemia (49).

À luz desses conhecimentos, uma série de estudos identificou a hiperinsulinemia isolada ou associada à hipoglicemia reacional como a alteração metabólica mais prevalente em indivíduos portadores de patologias labirínticas, nas suas mais diversas manifestações (14,16-19,50).

- Kirtane et al., em 1984, avaliaram 31 indivíduos portadores da doença de Ménière através de curvas de 5 horas com dosagem de glicose e insulina. Apenas dois indivíduos apresentaram curva glicêmica alterada; em contrapartida, os valores da curva insulínica foram anormais em 21 indivíduos (68%), sendo 18 do tipo II e três do tipo III_A (17).
- Em 2001, Kazmierczak e Doroszewska avaliaram 48 indivíduos portadores de vertigem, zumbido ou perda auditiva de causa desconhecida, através do teste de tolerância à glicose de 5 horas e identificaram alteração nas curvas de glicose e

insulina em 13 (27,1%), sendo que o hiperinsulinismo foi a alteração metabólica mais freqüente (18).

- D'Ávila e Lavinsky, em 2005, estudaram o perfil glicídico e suas correlações na doença de Ménière e demonstraram que 72% dos pacientes estudados tinham graus variáveis de hiperinsulinemia detectáveis na curva insulinêmica de 5 horas (19).

Alguns estudos demonstram a efetividade de propostas terapêuticas para pacientes hiperinsulinêmicos portadores de patologias labirínticas, com ênfase no manejo dietético e comportamental. A dieta geralmente prescrita apresenta características hipoglicídicas e hiperprotéicas, e foi proposta por Updegraff e Koniz em 1977 (51) e adaptada por Ramos em 1980 (52).

- Lavinsky et al., em 2004, estudaram a efetividade do tratamento dietético em 80 pacientes com zumbido e hiperinsulinismo. O grupo de pacientes que seguiu a dieta prescrita apresentou significativa melhora em relação ao grupo que manteve a dieta convencional (53).
- Em 2000, Caovilla et al. estudaram a efetividade do manejo dietético e de modificações de hábitos cotidianos em 440 pacientes portadores de diversas formas de labirintopatias por hiperinsulinismo, observando redução ou desaparecimento subjetivo do zumbido em 79,6% dos casos e da vertigem ou outros tipos de tontura em 83,4% dos pacientes, assim como melhora subjetiva da audição em 50% dos pacientes com queixa prévia de hipoacusia. Melhora parcial ou normalização dos limiares auditivos foram observados em 45,1% de 113 pacientes com hipoacusia determinada por audiometria tonal (54).
- Ramos e Ramos, em 1993, avaliaram 200 pacientes portadores de disfunções cocleovestibulares e alterações na curva insulinêmica, considerando a evolução dos

sintomas e dos limiares auditivos após instituição de dieta por 90 dias. Houve diminuição significativa dos sintomas (principalmente cefaléia e vertigem) e melhora ou normalização dos limiares tonais em, respectivamente, 54,2 e 40,3% dos 129 indivíduos com alteração audiométrica prévia ao estudo (55).

Como já descrito, o hiperinsulinismo está presente em todas essas formas de alteração do metabolismo dos carboidratos, sejam elas precoces ou tardias, como resultado de um mecanismo pancreático compensatório à resistência aumentada da insulina nos seus receptores periféricos (56).

A “síndrome da resistência à insulina” foi descrita em 1988 a partir de estudos que identificaram sua presença em um importante grupo de indivíduos de alto risco para doenças cardiovasculares: portadores de obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia e DMNID (57). A freqüente coexistência dessas situações em um mesmo indivíduo levou à hipótese da existência de uma anormalidade metabólica comum que permitisse o seu aparecimento. Tal fator seria a resistência dos receptores periféricos à ação da insulina (56). Entretanto, uma relação de causa e efeito entre resistência à insulina e doença cardiovascular e o mecanismo pelo qual essa resistência influencia o seu desenvolvimento são questões ainda não totalmente esclarecidas.

Indivíduos suscetíveis a tornarem-se insensíveis à ação da insulina e, conseqüentemente, desenvolverem hiperinsulinismo são aqueles com história de DM em parentes de primeiro grau, história prévia de DM gestacional, obesos (principalmente aqueles com adiposidade abdominal), intolerantes à glicose e mulheres com síndrome dos ovários policísticos (56).

Existe um relativo consenso, porém, de que essas formas de alteração no metabolismo dos carboidratos devem ser manejadas dentro de um contexto dietético e

comportamental, como forma de reduzir a incidência de complicações cardiovasculares, assim como impedir a progressão para DMNID (58).

3.5. Da ECoG em situações normais e patológicas

Potenciais elétricos são modificações de voltagem decorrentes do transporte de íons através da membrana celular. O registro desses potenciais pode ser realizado através de eletrodos situados nas superfícies corporais cutâneas e nas mucosas ou mesmo inseridos dentro dos tecidos. A amplitude desses potenciais é pequena, sendo medida na escala de microvolts. Desta forma, geralmente o sinal obtido deve ser amplificado para trazê-lo para a faixa passível de leitura pelos conversores analógico-digitais. Obviamente, quanto mais próximo da fonte estiver o eletrodo de registro, menor será a amplificação necessária.

Os potenciais são ditos “evocados” quando ocorrem após estimulação externa. Nos potenciais evocados auditivos, a estimulação é acústica, e as formas mais comuns de aplicação clínica são a audiometria de tronco cerebral (*auditory brainstem response audiometry*, ABR, ou potencial evocado auditivo de tronco encefálico, PEATE) e a ECoG.

A ECoG é o método de registro dos potenciais elétricos evocados na cóclea e no nervo auditivo (4). Os potenciais obtidos são classificados como **precoces** ou de **curta latência**, podendo ocorrer dentro de até 2 ms após o estímulo.

A estimulação sonora é realizada pela repetição de sinais acústicos de curta duração. O clique de banda larga ou *broad band click* (BBC) proporciona a ativação sincrônica das respostas dos neurônios do nervo auditivo, que correspondem às frequências de 2.000 a 4.000 Hz na membrana basilar. Frequências específicas podem ser estimuladas através de pulsos senoidais (*tone pips* ou *tone bursts*).

O uso clínico da EcoG ganhou espaço a partir dos estudos realizados por Portmann, Le Bert e Aran durante a década de 1960 em Bordeaux, França. A publicação deste grupo

está entre os primeiros relatos de registro efetivo da atividade elétrica coclear em seres humanos (59). O eletrodo primário (ou de registro) era colocado junto à janela redonda através de paracentese timpânica ou mesmo por uma perfuração timpânica preexistente.

A necessidade de paracentese timpânica certamente tornou o método pouco atraente aos otologistas. Tradicionalmente, o eletrodo primário é colocado em contato com a mucosa do promontório. Nos últimos anos, entretanto, resultados confiáveis têm sido obtidos através de eletrodos posicionados em contato com a membrana timpânica (60). Essa técnica alia menor desconforto, pouca morbidade e boa confiabilidade. Os parâmetros de registro são praticamente idênticos, porém o sinal obtido pelo método extratimpânico necessita maior amplificação quando comparado ao da técnica convencional.

Durante o registro, são identificados três componentes:

- **Microfonismo coclear.** Fenômeno de origem celular que corresponde à entrada de potássio proveniente da endolinfa nas células ciliadas cocleares. Sua aplicação clínica é limitada, e a resposta depende do tipo e do local do eletrodo. Nos registros não-invasivos, freqüentemente é difícil individualizar o MC dentro dos artefatos.
- **Potencial de somação (PS).** Potencial registrado na cóclea em resposta ao estímulo. Representa provavelmente os desvios das células ciliadas externas e, em menor proporção, das células ciliadas internas. Parece relacionar-se à excursão da membrana basilar em direção à escala média.
- **Potencial de ação (PA).** Potencial mais proeminente obtido através do método. Corresponde à despolarização sincrônica das milhares de fibras neurais que compõem a porção auditiva do VIII par craniano. Esse potencial é idêntico à onda I obtida no exame PEATE (4).

A principal aplicação clínica da EcoG é no diagnóstico e seguimento da hidropisia endolinfática (4). Em orelhas hidrópicas, a amplitude do PS encontra-se freqüentemente aumentada. Desta forma, ao se calcular a razão entre as amplitudes dos potenciais de ação e somação (razão PS/PA), observam-se valores mais elevados. Razões acima de 0,3 sugerem a presença de hidropisia endolinfática (61,62). Alguns autores, entretanto, não consideram que a relação PS/PA seja definitiva para o diagnóstico da hidropisia, mas concordam com seu valor na monitorização e no acompanhamento clínico de pacientes hidrópicos (63).

Esse método também pode ser empregado na aquisição ou amplificação da onda I do PEATE quando esta não é obtida pela técnica convencional, assim como na monitorização intra-operatória em situações onde existe risco de dano cirúrgico à cóclea ou ao nervo auditivo (4).

3.6. Da ovelha como animal de experimentação

Ovinos têm sido empregados como modelos de experimentação animal em uma série de especialidades médicas, dentre as quais destacam-se a ortopedia, a obstetrícia e, principalmente, a genética. Na otorrinolaringologia, há estudos em todas as subáreas do conhecimento: laringologia, nasossinusologia, otologia e otoneurologia. Essas publicações, entretanto, são em pequeno número e não seguem uma linha de pesquisa definida.

O Grupo de Pesquisa em Otologia e Otoneurologia do HCPA, capitaneado pelo Prof. Dr. Luiz Lavinsky e do qual faz parte o autor desta dissertação, tem tido êxito no emprego da ovelha como animal de experimentação desde a década passada, e vem demonstrando, pioneiramente, que este modelo é adequado à experimentação animal e ao treinamento cirúrgico nas orelhas média e interna (64-68).

As semelhanças entre as orelhas média e interna de ovinos e humanos também vêm sendo demonstradas em uma série de outros trabalhos, que envolveram análises histológicas (69) e morfológicas, tanto pela dissecação de ossos temporais (70) como pelo emprego da tomografia computadorizada (71,72). Recentemente, a ovelha foi empregada com sucesso na investigação das repercussões do hiperinsulinismo na atividade das células ciliadas externas cocleares, através do registro de emissões otoacústicas (73).

A experiência adquirida pelo Grupo de Pesquisa no emprego de ovelhas dentro da Unidade de Experimentação evidenciou que esses animais são bastante resistentes a procedimentos cirúrgicos (65,66) e apresentam excelente cicatrização tecidual. Períodos de observação prolongada podem ser realizados no campo, dispensando a necessidade de manutenção em gaiolas e, assim, contribuindo para a redução de custos e para o maior conforto dos animais.

Apesar de volumosos, com peso médio adulto em torno de 40 kg, esses animais são de fácil manuseio na Unidade de Experimentação, ao contrário de cães, gatos e macacos, que podem se tornar agressivos. Acrescentamos, ainda, o fato de que o uso experimental de animais de estimação apresenta repercussões psicossociais, além de possíveis conflitos com as sociedades protetoras de animais (66). Finalmente, destaca-se a alta disponibilidade desses animais no nosso meio, uma vez que são criados para o fornecimento de carne e lã.

Resumidamente, por sua rusticidade, disponibilidade, docilidade, resistência e baixo custo de manutenção, os ovinos têm sido considerados animais especialmente adequados para o treinamento e a experimentação em cirurgia otológica (66,68).

4. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo experimental foi conduzido nas dependências da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA, tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação desta Instituição.

4.1. Características da amostra

A amostra foi constituída de seis (6) ovelhas macho adultas da raça *Corriedale*, com peso entre 40 e 43 kg, divididas randomicamente em dois grupos de igual tamanho.

4.2. Intervenção

Após a alocação de cada animal para um dos grupos de estudo e vencida a etapa anestésica, cujos detalhes serão apresentados na próxima seção, os animais foram submetidos às seguintes intervenções:

1. **Grupo intervenção (n = 3).** Após coleta de sangue periférico para dosagem de glicose e insulina plasmáticos e concomitante registro da atividade coclear através da ECoG, foi administrada insulina regular na dose de 0,1 U/kg de peso diluída em 20 mL de solução fisiológica pela via endovenosa. O registro da atividade coclear e a coleta sanguínea foram novamente realizados a cada 10 minutos até um total de 90 minutos.
2. **Grupo controle (n = 3).** Após coleta de sangue periférico para dosagem de glicose e insulina plasmáticos e concomitante registro da atividade coclear através da ECoG, foram administrados 20 mL de solução fisiológica pela via endovenosa. Assim como no grupo intervenção, o registro da atividade coclear e a coleta

sangüínea foram novamente realizados a cada 10 minutos até um total de 90 minutos.

4.3. Anestesia

Devido ao lento esvaziamento gástrico observado em ovinos, os animais foram submetidos a um período prévio de jejum de 48 horas. Para a sedação pré-anestésica, empregamos acepromazina a 1% (Acepran®, Univet) em dose única de 500 mg/kg por via intramuscular. A seguir, os animais foram transportados à sala cirúrgica e posicionados em decúbito lateral direito sobre colchão térmico aquecido (TermWay®). O acesso venoso (veia jugular externa) foi obtido com cateter venoso periférico 18G (Jelco®, Johnson & Johnson), por onde se realizou a indução anestésica com tiopental sódico (Thionembutal®, Abbott) na dose de 15 mg/kg. Para a manutenção anestésica, foi utilizada a mesma droga, na dose contínua de 600 mg/h em bomba de infusão (Nutrimat II®, B.Braun). Os animais foram submetidos a intubação orotraqueal sob laringoscopia direta (lâmina reta, 18,5 cm de comprimento), com tubos traqueais números 8 ou 9, acoplados a carro de anestesia (Modulus 4000, Narcosul) com sistema fechado e com fornecimento de oxigênio a 100% (Figura 2). Foram monitorados a saturação de oxigênio e o pulso periférico (oxímetro de pulso Biox 3700e®, Ohmeda).

Após o experimento, os animais passaram por período de recuperação de aproximadamente 2 horas dentro da Unidade de Experimentação, sendo então transportados ao local de origem.



Figura 2. Aspecto final do animal após anestesia e intubação orotraqueal.

4.4. Exposição da membrana timpânica

Para a visualização da membrana timpânica, foi necessária incisão cirúrgica endo-pré-auricular de pele e cartilagem da orelha externa, com cerca de 2 cm (Figura 3), realizada com bisturi elétrico (Medecir, modelo BMO-870) após bloqueio local com cloridrato de bupivacaína 0,75%. Esse procedimento retificou o canal auditivo externo, possibilitando a colocação do otocone adaptado a partir de uma almotolia plástica (Figura 4).



Figura 3. Incisão cirúrgica endo-pré-auricular para visualização da membrana timpânica.



Figura 4. Otocone adaptado ao conduto auditivo externo.

4.5. Coleta sanguínea de glicose e insulina

As coletas de sangue periférico foram realizadas através do acesso venoso periférico no tempo 0 (zero) e a cada 10 minutos, até 90 minutos. A glicose foi medida pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase, com a utilização do *kit* da Labtest. A insulina foi medida por imunensaio de eletroquimioluminescência, sendo

utilizados analisadores Modular Analytics E170 da Roche. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

4.6. Registro dos potenciais evocados auditivos

O registro dos potenciais evocados auditivos foi realizado pelo sistema Morfeu All-In-One, desenvolvido pela Dolsch Instrumentação Biomédica, de Porto Alegre (RS). A análise dos registros foi realizada através do *software* Clampfit 9.2, desenvolvido pela Axon Instruments. Na Figura 5 vemos um exemplo da interface propiciada pelo programa.

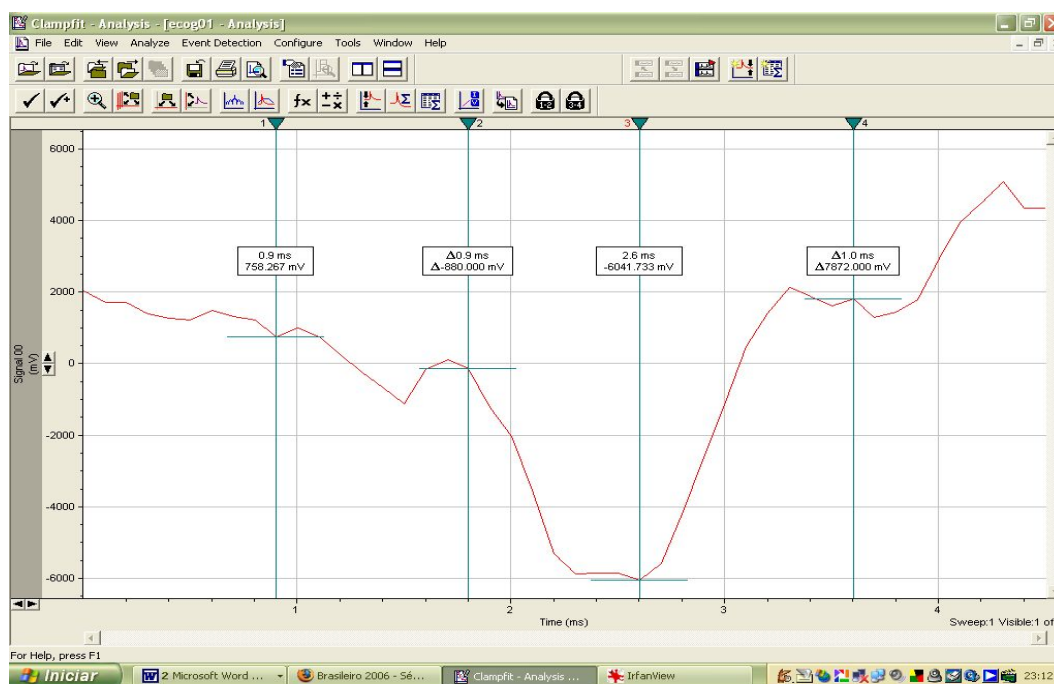


Figura 5. Interface do *software* Clampfit 9.2.

O método utilizado foi o **transtimpânico**, com eletrodo de inserção da marca Medelec, com área de 0,07 mm (código N53159), em contato com a mucosa do promontório. O eletrodo secundário foi colocado na mucosa nasal.

O estímulo acústico era fornecido através de microfone colocado junto ao meato acústico externo com intensidade de 110 decibéis de nível de pressão sonora (dBNPS). O estímulo era do tipo *toneburst* nas frequências de 5, 6, 7, 8, 9 e 10 kHz, numa taxa de 10 estímulos por segundo, com 3.000 repetições, sendo que cada frequência era estimulada por 50 segundos. A polaridade era do tipo condensação, o sinal era amplificado em 100.000 vezes e os filtros eram de 15 e 15.000 Hz (74).

Conforme descrito anteriormente, esse registro foi realizado concomitantemente à coleta de sangue periférico, a cada 10 minutos, por um total de 90 minutos após a intervenção.

5. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Fixando-se o valor de alfa em 0,05 e o poder estatístico do estudo em 80%, para detectar uma diferença entre os grupos estimada em pelo menos 3,5 unidades de desvio padrão, calculou-se que três indivíduos seriam necessários em cada grupo.

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão. O registro do PA coclear foi apresentado em *folds*, ou seja, a razão dos valores observados nos diferentes momentos pela medida basal. A análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas foi aplicada aos valores do PA coclear e da glicemia. Os dados basais obtidos nos dois grupos foram comparados pelo teste *t* de Student para amostras independentes. O nível de significância foi de alfa = 0,05.

Os dados foram analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 12 e apresentados graficamente com o programa SigmaPlot versão 8.0.

6. RESULTADOS

Durante a etapa de experimentação, não houve perda de nenhum animal. O protocolo anestésico mostrou-se seguro e efetivo. O método proposto promoveu hiperinsulinemia e hipoglicemia, como pode ser visto nas Figuras 6 e 7, assim como nas Tabelas 3 a 9 do Anexo.

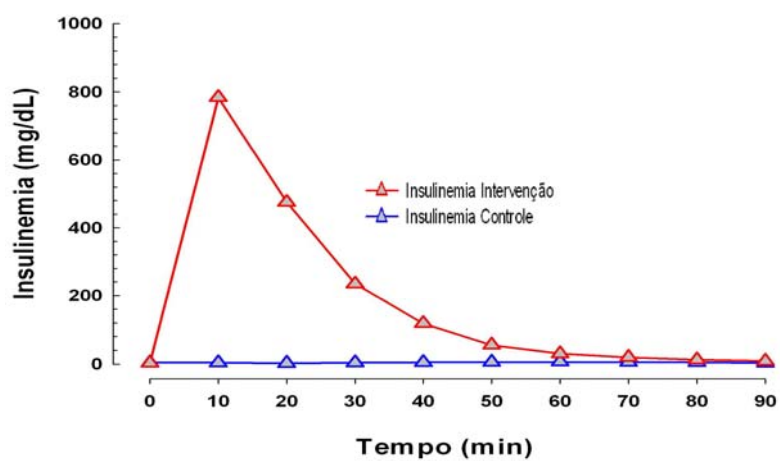


Figura 6. Média da insulinemia nos grupos intervenção e controle durante 90 minutos.

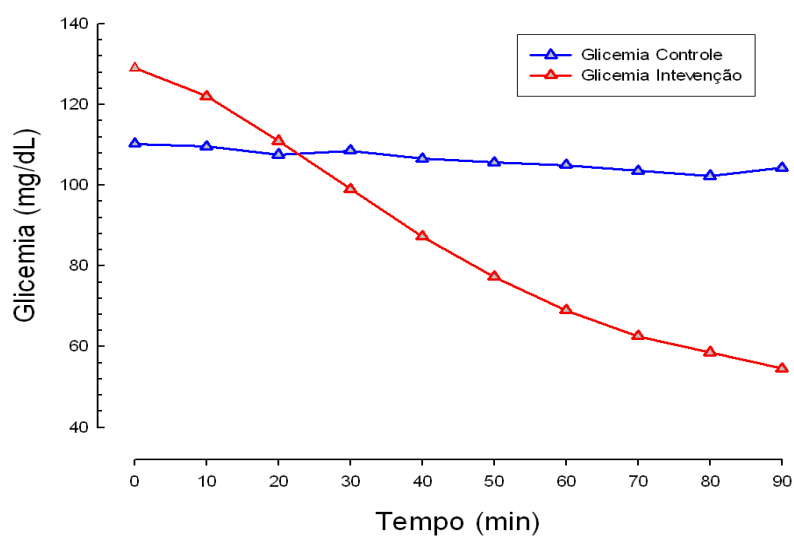


Figura 7. Média da glicemia nos grupos intervenção e controle durante 90 minutos.

A obtenção da atividade elétrica coclear foi satisfatória em todos os animais, como se pode ver nas Figuras 8 e 9, referentes aos grupos intervenção e controle, respectivamente. O PA do nervo coclear foi a atividade predominante; o PS não foi obtido em todos os animais.

No que tange a insulinemia, glicemia e amplitude do PA, os dois grupos foram considerados semelhantes no momento basal, com $p = 0,59$, $0,14$ e $0,11$, respectivamente. Ao avaliar as curvas de registro do PA pelo teste de ANOVA de medidas repetidas, observou-se que o grupo intervenção apresentou uma queda estatisticamente significativa nos valores do PA em relação ao grupo controle ($p = 0,001$).

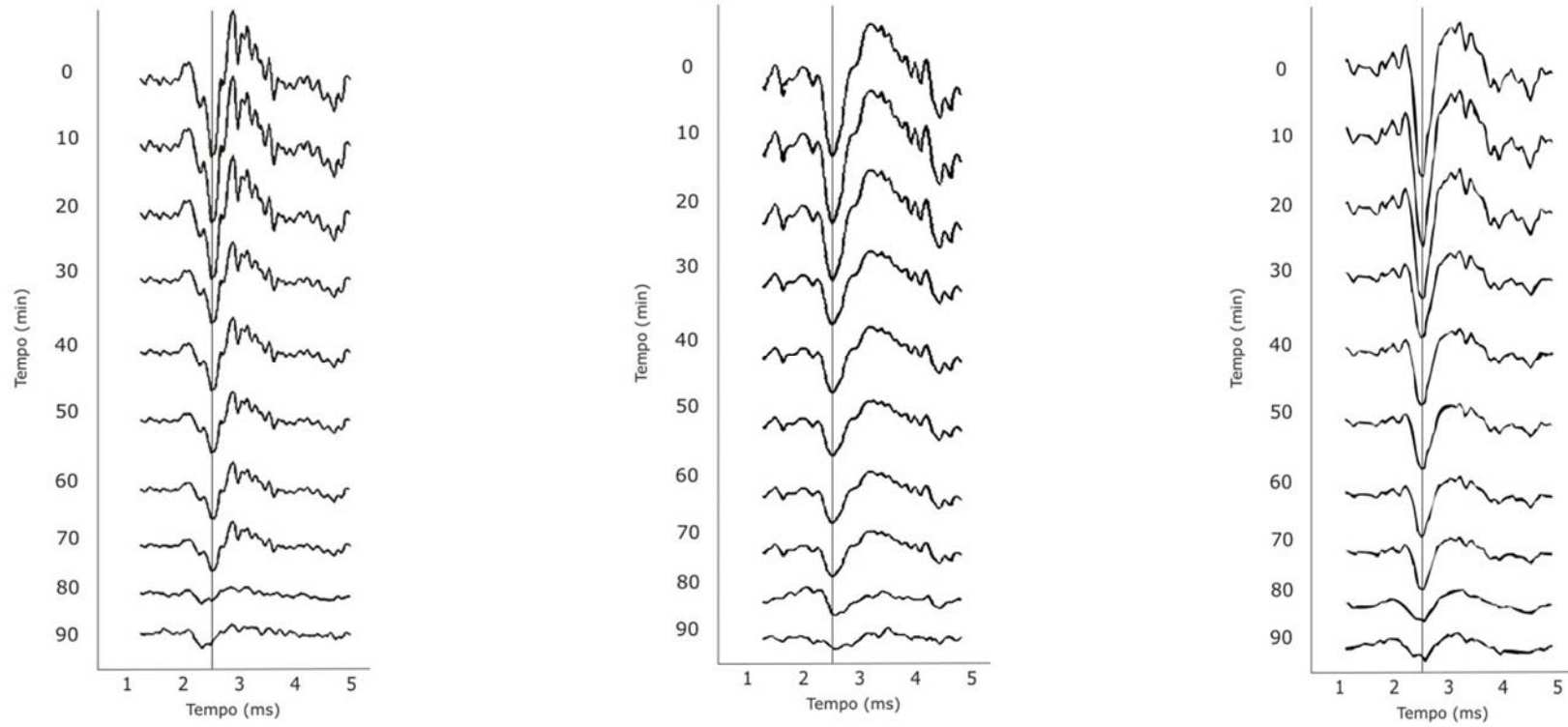


Figura 8. Traçados eletrociclográficos obtidos nos animais 1, 2 e 3 (grupo intervenção).

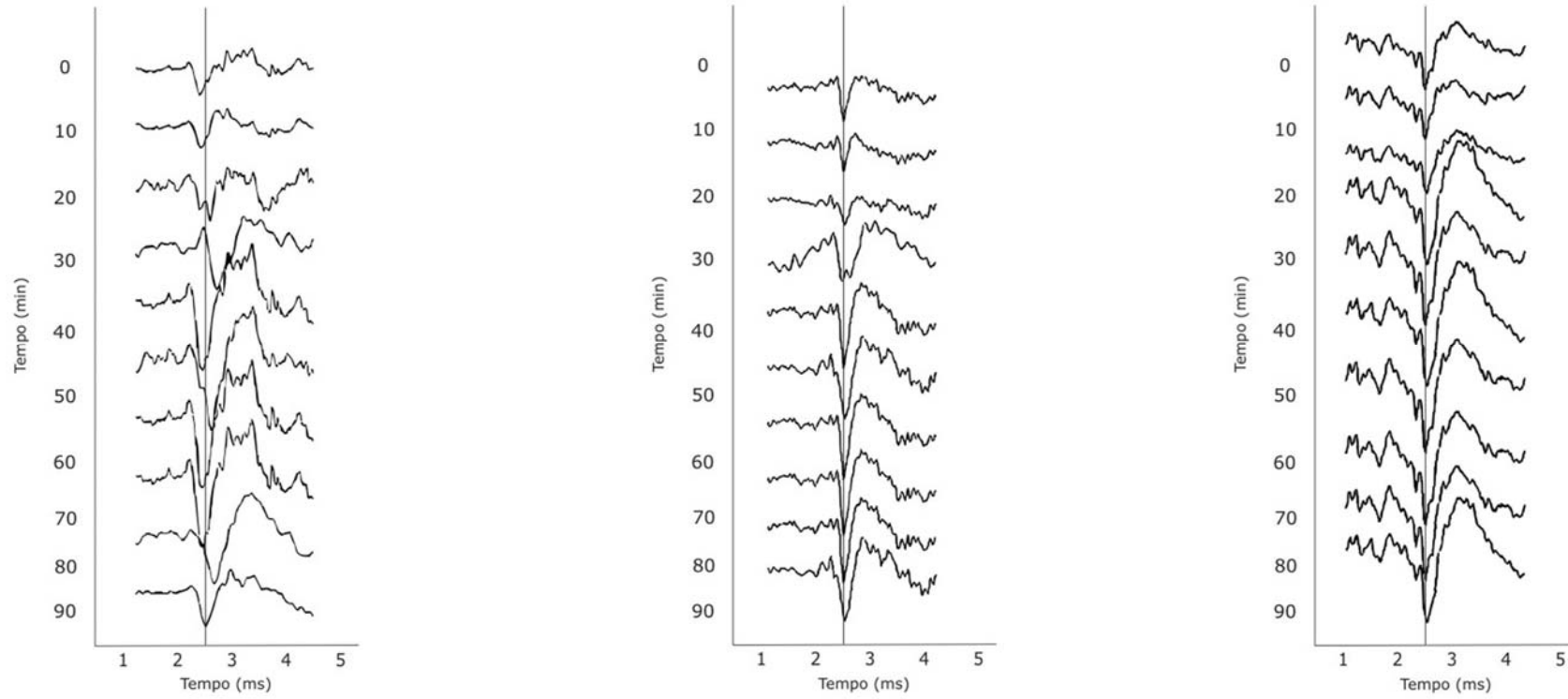


Figura 9. Traçados electrocoelegráficos obtidos nos animais 4, 5 e 6 (grupo controle).

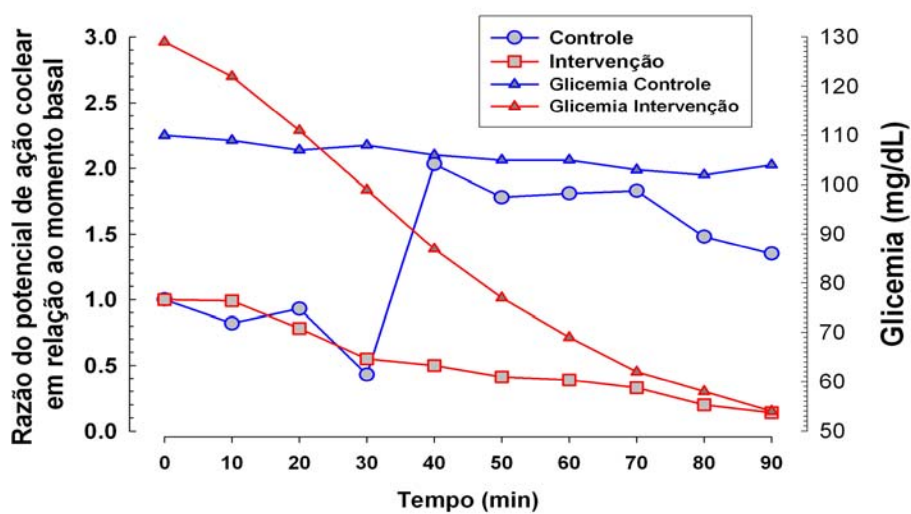


Figura 10. Médias observadas nos grupos intervenção e controle para a razão (*fold*) do potencial de ação coclear em relação ao momento basal e aos níveis de glicemia.

7. DISCUSSÃO

O conceito de que o hiperinsulinismo isolado (com euglicemia ou mesmo com hipoglicemia reacional) representa a primeira etapa no desenvolvimento da TDG e do DMNID abriu uma nova possibilidade de detecção precoce dessas dismetabolopatias, assim como um vasto campo de pesquisa acerca de suas repercussões clínicas.

O real impacto dos estados hiperinsulinêmicos na função labiríntica ainda é motivo de controvérsia. A elevada incidência de indivíduos portadores dessas formas de alterações metabólicas entre pacientes labirintopatas representa uma evidência indireta – embora consistente – dessa associação (20).

Com o objetivo de demonstrar e compreender melhor a relação entre as alterações metabólicas descritas e os mecanismos que levam ao desenvolvimento de patologias labirínticas, o Grupo de Pesquisa em Otologia e Otoneurologia do HCPA tem desenvolvido uma série de trabalhos nessa linha de pesquisa (19,49,53,73), obtendo resultados que convergem com aqueles publicados por outros grupos no Brasil (14,55) e no exterior (75).

Não obstante o ceticismo observado por algumas escolas, acreditamos que a repercussão dos estados hiperinsulinêmicos na orelha interna – especialmente na estria vascular – deve-se às características iônicas e metabólicas ali encontradas.

Seguindo essa linha de pesquisa, este projeto experimental teve como objetivo identificar e analisar, através da ECoG transtimpânica, alterações na atividade elétrica coclear após a indução de hiperinsulinismo agudo em um modelo animal, fornecendo, desta forma, subsídios para uma compreensão mais adequada dos reais efeitos dessa alteração metabólica na função auditiva.

Para demonstrar esse efeito, foi empregado o protocolo de infusão de insulina regular humana na dose de 0,1 U/kg. Essa dosagem é a mesma administrada em humanos durante o **teste de tolerância à insulina**, empregado no diagnóstico da deficiência do hormônio do crescimento (*growth hormone*, GH), uma vez que a liberação desse hormônio é induzida pela hipoglicemia. Este protocolo atingiu o objetivo de promover a hiperinsulinemia e a hipoglicemia desejadas.

Na literatura médica atual, não há trabalhos que tenham empregado a ECoG em ovinos adultos, e nisso está a originalidade ao estudo. Os parâmetros utilizados se tornam, desta forma, referência para estudos desenvolvidos por este ou outros grupos de pesquisa.

Desde o estudo pioneiro de Lavinsky e Goycoolea (64), o emprego de ovinos como modelo de experimentação animal em otologia tem sido adotado pelo grupo. Em trabalhos subseqüentes, os autores (65-72) demonstraram a similaridade entre a anatomia, a histologia e a morfologia da orelha dos ovinos e dos humanos, caracterizando esse modelo como uma excelente opção para o treinamento cirúrgico e a investigação experimental (66-68).

Na Unidade de Experimentação, os animais demonstraram ser dóceis e de fácil manuseio. Suas dimensões permitiram o uso do mesmo instrumental cirúrgico destinado a humanos. Após a recuperação anestésica, os animais foram encaminhados ao local de origem, sem a necessidade de acondicionamento em gaiolas ou estruturas similares, o que contribuiu para a redução dos custos. Além disso, apresentaram excelente cicatrização tecidual.

Outra vantagem no uso desses animais é sua fácil disponibilidade em nosso meio, onde são criados para consumo humano e fornecimento de lã. Como não são animais domésticos, seu uso é bem visto pelos comitês de ética em pesquisa e melhor aceito pelas sociedades defensoras dos animais.

O tamanho da amostra foi estabelecido a partir de criteriosas análises estatísticas que, frente à magnitude do efeito encontrado, identificaram como adequado o número de seis (6) animais divididos em dois grupos de igual tamanho. Considerando os aspectos éticos e financeiros envolvidos, decidiu-se pelo encerramento da etapa de experimentação tão logo esse número de animais fosse alcançado.

O protocolo anestésico foi seguro e efetivo, não havendo nenhum óbito. O sucesso foi devido, entre outros fatores, a uma execução sempre sob as mesmas condições materiais e humanas e por uma equipe médico-veterinária capacitada, com larga experiência no manejo de ovinos.

Durante a fase de experimentação, para a exposição da membrana timpânica, foi fundamental a realização da incisão endo-pré-auricular descrita anteriormente (Figura 3). Essa etapa representou um verdadeiro desafio, uma vez que o canal auditivo dos ovinos é longo e tortuoso, e os otocones usados em humanos não se adaptam às suas características anatômicas. Por outro lado, o uso de espéculos nasais de hastes longas expõe a membrana, mas não fornece estabilidade. A solução encontrada foi original e efetiva, através da ponteira de uma almotolia plástica, facilmente encontrada no meio hospitalar. Esse otocone adaptado, após a secção de cerca de 1 cm na extremidade para a ampliação da sua luz, expôs a membrana e permitiu a estabilidade pelo tempo necessário à manutenção do eletrodo (Figura 4).

Em relação ao método de aferição da audição, a ECoG demonstrou ser um exame de fácil execução e baixo custo. O método transtimpânico tem sido abandonado em humanos, em benefício de técnicas não-invasivas. Entretanto, sua principal vantagem está na proximidade do eletrodo de registro com a fonte da atividade elétrica, aumentando a intensidade do sinal obtido. O desconforto gerado pela timpanotomia foi mínimo,

considerando que o traumatismo é pequeno e que os animais encontravam-se sob efeito anestésico adequado.

Na ausência de parâmetros eletrococleográficos prévios, decidiu-se pelo uso do *toneburst*, e não do BBC. Inicialmente, foi realizada uma varredura de frequências para determinar em quais delas haveria respostas evocadas consistentes. Foram testadas frequências entre 1 e 15 kHz, e decidiu-se pelo uso daquelas entre 5 e 10 kHz. Curiosamente, a resposta nas frequências entre 1 e 3 kHz foi pouco consistente.

Os traçados obtidos representaram alterações de voltagem geradas na cóclea e no nervo auditivo e correspondem às etapas de despolarização e polarização celular ou, em última instância, ao transporte iônico pela membrana da célula. Como essa atividade exige um intenso gasto energético, sendo suscetível à interferência das concentrações de insulina e glicose plasmáticas, a ECoG representa um papel promissor na pesquisa experimental sobre as repercussões cocleares dessas dismetabolopatias.

O PA coclear corresponde à despolarização sincrônica das milhares de fibras neurais que compõem a porção auditiva do VIII par craniano, e foi a resposta mais evidente em todos os traçados. Já o PS foi obtido de modo consistente apenas nos animais 1 e 6, tornando-se, desta forma, indisponível para uma análise adequada. A incapacidade do método em obter o registro do PS em todos os animais se deveu, provavelmente, ao desconhecimento prévio dos parâmetros eletrococleográficos dos ovinos.

Em relação aos resultados obtidos, identificamos que houve indução de um marcado hiperinsulinismo; por outro lado, a hipoglicemia, apesar de efetivamente obtida, não resultou tão consistente. Desta forma, consideramos que os efeitos decorrentes da exposição foram secundários principalmente ao hiperinsulinismo e, em menor grau, à hipoglicemia, conforme demonstrado por Mangabeira-Albernaz e Fukuda (14).

A resposta elétrica mais evidente foi a progressiva diminuição na amplitude do PA neural observada no grupo de estudo. Esse efeito decorre da incapacidade da fibra neural em despolarizar-se e, assim, transmitir o estímulo acústico.

Essa diminuição da atividade observada no grupo exposto ao hiperinsulinismo agudo pode ser explicada por dois mecanismos:

- Numa primeira hipótese, o hiperinsulinismo atua diretamente nas fibras que compõem o nervo, comprometendo o transporte iônico pela membrana celular e impedindo sua despolarização.
- Uma segunda alternativa sugere que o hiperinsulinismo atua na estria vascular, comprometendo a manutenção do potencial endococlear e, desta forma, a despolarização das células ciliadas. A supressão desse potencial se reflete, então, na etapa subsequente de despolarização celular da fibra neural.

Na ausência de um modelo teórico que justifique a neuropatia periférica como consequência do hiperinsulinismo agudo, acreditamos que tal efeito foi coclear, e o resultado efetivamente medido apenas espelhou essa condição. Em recente estudo conduzido por Maia (73), a atividade coclear de ovinos, medida através das otoemissões acústicas por produtos de distorção (EOAPD), foi significativamente reduzida após a indução de hiperinsulinismo, em um delineamento semelhante ao empregado no presente estudo, corroborando a existência de um efeito predominantemente coclear, e não neural.

O bloqueio da atividade da enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria vascular parece ser o modelo que justifica os achados do presente estudo. Essa enzima é fundamental na produção da energia necessária à manutenção do potencial endococlear, e seu bloqueio modifica a composição iônica tanto da endolinfa como da perilinfa, impedindo a despolarização das células ciliadas.

Observamos que o período de hiperinsulinismo mais acentuado ocorreu, conforme esperado, no tempo 10, com progressiva redução nas aferições subseqüentes. A amplitude do PA apresentou uma queda progressiva, que iniciou no tempo 10, mas se tornou muito mais acentuada nos minutos finais do experimento. Essa falta de sincronismo entre o período de maior hiperinsulinismo e o período de menor amplitude do PA se explica, em um modelo teórico, pelo fato de que o bloqueio da ação da enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ acarreta um efeito mais tardio nas concentrações de potássio endolinfático, restando, nos minutos iniciais, moléculas suficientes para a despolarização celular.

A indução aguda de hiperinsulinismo em animais previamente sadios não reflete necessariamente as alterações observadas em indivíduos cronicamente expostos a níveis elevados de insulina como consequência do aumento da resistência periférica. Por exemplo, foi demonstrado experimentalmente que a indução de hiperinsulinismo em cachorros sadios não eleva a pressão arterial, mas esse efeito hipertensor ocorre em animais obesos e, teoricamente, com maior prevalência de resistência insulínica (76).

A resistência periférica à insulina tem sido exaustivamente estudada dentro de um contexto cardiovascular, mas muito pouco associada a patologias da orelha interna. Considerando os achados deste e de outros estudos desenvolvidos por este e outros grupos de pesquisa, podemos considerar que a resistência à insulina deva sempre ser suspeitada em indivíduos com patologias cocleovestibulares sem etiologia definida ou com características que os incluam dentro da já descrita “síndrome da resistência à insulina”. Da mesma forma, a curva glico-insulinêmica deve estar dentro dos exames laboratoriais solicitados na etapa de investigação diagnóstica.

Dentro dessa realidade, havendo suspeita clínica de hiperinsulinismo associado a hipoglicemia reacional, esta ocorre geralmente 3 horas após a sobrecarga oral de glicose.

Assim, o emprego da curva glico-insulinêmica de 5 horas aumenta o valor preditivo positivo do teste, conforme confirmado por Lavinsky et al. (77).

Um conceito mais recente em relação ao manejo dietético de pacientes com resistência à insulina e outras formas de alteração do metabolismo dos carboidratos foi proposto por Jenkins et al. em 1981 (78) e envolve a quantificação do **índice glicêmico** (IG). Os diferentes alimentos variam substancialmente no que diz respeito aos seus efeitos na glicemia pós-prandial e à liberação da insulina pelo pâncreas. Alimentos com alto IG têm uma elevada velocidade de absorção e conversão em glicose, o que eleva o pico insulinêmico após sua ingestão. A hipoglicemia pode advir quando a glicose ingerida for totalmente metabolizada, permanecendo os efeitos hipoglicemiantes da insulina.

Outras abordagens fundamentais no tratamento desses indivíduos envolvem perda de peso (para indivíduos obesos ou com sobrepeso) e realização de atividade física aeróbica regular, 3 a 4 vezes por semana, por 30 a 40 minutos (79); essas práticas estão associadas a um efetivo aumento na sensibilidade periférica à insulina.

O tratamento comportamental e dietético para indivíduos em etapas precoces de alterações do metabolismo dos carboidratos é corroborada por estudo que avaliou a progressão para o DMNID em indivíduos com hiperinsulinismo ou intolerantes à glicose (58). Um dos grupos foi tratado com metformin e o outro recebeu placebo. Após quase 3 anos de seguimento, a incidência de DM foi de 7,8 casos em 100 pessoas/ano contra 11,0 casos no grupo tratado com placebo. Entretanto, um terceiro grupo tratado exclusivamente com um programa intensivo de modificação de hábitos teve uma incidência de diabetes de 4,8 casos por 100 pessoas/ano, resultado significativamente menor que os dois grupos anteriores.

Sintomas cocleovestibulares, reconhecidamente de alta prevalência na prática clínica diária, podem ser entendidos como um indicador precoce da presença de alterações

no metabolismo dos hidratos de carbono. Assim, ao diagnosticar indivíduos hiperinsulinêmicos cuja apresentação clínica envolve sinais e sintomas cocleovestibulares, pode-se interromper ou retardar a progressão para formas mais avançadas de alteração do metabolismo dos carboidratos, o que representa um impacto de grande magnitude na saúde do indivíduo e, em maior escala, da população.

8. REFERÊNCIAS

1. Smith CA, Lowry OH, Wu ML. The electrolytes of the labyrinthine fluids. *Laryngoscope* 1954;64(3):141-53.
2. Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol*. 2006;576(Pt 1):11-21.
3. Battey JF Jr. A genetic approach to understanding inner ear function. *J Clin Invest*. 2000;106(12):1431-2.
4. Ferraro JA, Krishnan G. Cochlear potentials in clinical audiology. *Audiol Neurootol*. 1997;2(5):241-56.
5. Updegraff WR. Impaired carbohydrate metabolism and idiopathic Meniere's disease. *Ear Nose Throat J*. 1977;56(4):160-3.
6. Kraft JR. Hyperinsulinemia: a merging history with idiopathic tinnitus, vertigo, and hearing loss. *Int Tinnitus J*. 1998;4(2):127-30.
7. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes*. 1979;28(12):1039-57.
8. Kraft JR. Detection of diabetes mellitus in situ (occult diabetes). *Lab Med*. 1975;6:10-22.
9. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 years before clinical diagnosis. *Diabetes Care*. 1992;15(7):815-9.
10. D'Ávila C, Lavinsky L. Tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos com repercussão na orelha interna. In: Lavinsky L, editor. *Tratamento em otologia*. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 373-7.

11. Kuijpers W, Bonting SL. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated ATPase. XXIV. Localization and properties of ATPase in the inner ear of the guinea pig. *Biochim Biophys Acta*. 1969;173(3):477-85.
12. Thalmann R, Miyoshi T, Thalmann I. The influence of ischemia upon the energy reserves of inner ear tissues. *Laryngoscope*. 1972;82(12): 2249-72.
13. Tasaki I, Spyropoulos CS. Stria vascularis as source of endocochlear potential. *J Neurophysiol*. 1958;22(2):149-55.
14. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol*. 1984;97(5-6):496-501.
15. Fukuda Y. Zumbido neurossensorial. *Rev Neurociências*. 2000;8(1):6-10.
16. Proctor CA. Abnormal insulin levels and vertigo. *Laryngoscope*. 1981;91(10):1657-62.
17. Kirtane MV, Medikeri SB, Rao P. Blood levels of glucose and insulin in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1984;406:42-5.
18. Kazmierczak H, Doroszevska G. Metabolic disorders in vertigo, tinnitus, and hearing loss. *Int Tinnitus J*. 2001;7(1):54-8.
19. D'Avila C, Lavinsky L. Glucose and insulin profiles and their correlations in Meniere's disease. *Int Tinnitus J*. 2005;11(2):170-6.
20. 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):801-6.
21. Wangemann AP, Schacht J. Homeostatic mechanisms in the cochlea. In: Fay RR, Popper AN, editors. *Handbook of auditory research*. Vol IX: The Cochlea (Dallos P, ed). Springer: New York; 1996. pp. 130-5.

22. Pujol R. Anatomie et physiology de la cochlée. *Arch Int Physiol Biochim.* 1989;97(4):A51-78.
23. Laurikainen EA, Costa O, Miller JM, Nuttall AL, Ren TY, Masta R, et al. Neuronal regulation of cochlear blood flow in the guinea-pig. *J Physiol.* 1994;480(Pt 3):563-73.
24. Duvall AJ 3rd, Hukee MJ. Delineation of cochlear glycogen by electron microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1976;85(2 Pt. 1):234-46.
25. Thalmann R, Thalmann I, Ise I, Paloheimo S. Noxious effects upon cochlear metabolism. *Laryngoscope.* 1977;87(5 Pt 1):699-721.
26. Yamamoto H, Makimoto K. Sensitivity of the endocochlear potential level to cochlear blood flow during hypoventilation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109(10 Pt 1):945-51.
27. Morizane I, Hakuba N, Shimizu Y, Shinomori Y, Fujita K, Yoshida T, et al. Transient cochlear ischemia and its effects on the stria vascularis. *Neuroreport.* 2005;16(8):799-802.
28. Knight LC, Saeed SR, Hradek GT, Schindler RA. Insulin receptors on the endolymphatic sac: an autoradiographic study. *Laryngoscope.* 1995;105(6):635-8.
29. Wang S, Schacht J. Insulin stimulates protein synthesis and phospholipid signaling systems but does not regulate glucose uptake in the inner ear. *Hear Res.* 1990;47(1-2):53-61.
30. Zuo J, Rarey KE. Responsiveness of alpha 1 and beta 1 cochlear Na, K-ATPase isoforms to thyroid hormone. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(3):422-8.
31. Rarey KE, Tyneway D, Patterson K. Decreased adenosine triphosphatase activity in the absence of adrenocorticosteroids. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;115(7):817-21.

32. Kanoh N. Dopamine inhibits the Na-K ATPase activity of the stria vascularis in the cochlea. In vivo ultracytochemical study. *Acta Otolaryngol.* 1995;115(1):27-30.
33. Kanoh N. Reserpine inhibits the Na-K ATPase activity of the stria vascularis in the cochlea. *Laryngoscope.* 1994;104(2):197-200.
34. Konishi T, Hamrick PE, Walsch PJ. Ion transport in guinea pig cochlea. I. Potassium and sodium transport. *Acta Otolaryngol.* 1978;86(1-2):22-34.
35. Wangemann P. K(+) cycling and its regulation in the cochlea and the vestibular labyrinth. *Audiol Neurotol.* 2002;7(4):199-205.
36. Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(2):C403-7.
37. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 2000;102(10):1178-85.
38. Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, Wu T, Jabba SV, Maganti RJ, et al. Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med.* 2004;2:30.
39. Lavinsky L. Dismetabolopatia dos glicídios e suas repercussões no ouvido interno. Apresentado no II Dia Luso-Brasileiro da Vertigem; 2006 abr 21; Cascais, Portugal.
40. Kakarlapudi V, Sawyer R, Staecker H. The effect of diabetes on sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol.* 2003;24(3):382-6.
41. McQueen CT, Baxter A, Smith TL, Raynor E, Yoon SM, Prazma J, et al. Non-insulin-dependent diabetic microangiopathy in the inner ear. *J Laryngol Otol.* 1999;113(1):13-8.
42. Jordão A. Estudos sobre a diabete. Lisboa: Typographia da Academia; 1864.

43. Jorgensen MB. Changes of aging in the inner ear, and the inner ear in diabetes mellitus. Histological studies. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1964;188:Suppl 188:125-8.
44. Vaughan N, James K, McDermott D, Griest S, Fausti S. A 5-year prospective study of diabetes and hearing loss in a veteran population. *Otol Neurotol.* 2006;27(1):37-43.
45. Diaz de Leon-Morales LV, Jauregui-Renaud K, Garay-Sevilla ME, Hernandez-Prado J, Malacara-Hernandez JM. Auditory impairment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2005;36(5):507-10.
46. Ramos S, Ramos RF. Medidas complementares no tratamento da vertigem. In: Ganança MM, editor. *Vertigem tem cura?* São Paulo: Lemos Editorial; 1998.
47. Kahn R. Molecular mechanisms of insulin action. *Annu Rev Med.* 1985;36:429-51.
48. Mendelsohn M, Roderique J. Cationic changes in endolymph during hypoglycemia. *Laryngoscope.* 1972;82(8):1533-40.
49. Koide 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.
50. Mangabeira Albernaz PL. Afecções da orelha interna por distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono: estudo evolutivo. *Acta ORL.* 2006;24(2):59-62.
51. Updegraff WR, Koniz M. Nutrition and its relationship to vertigo problems. Presented at the Continuing Medical Education Symposium, St. Francis Hospital; 1977 Mar 31-Apr 1; Poughkeepsie, USA.
52. Ramos S, Ramos RF, Rodrigues VM. Adaptação da dieta hipoglicídica e hiperprotéica de Updegraff, WR & Koniz, M para pacientes disglicêmicos. *Acta AWHO.* 1986;2-7.

53. Lavinsky L, Oliveira MW, Bassanesi HJ, D'Avila C, Lavinsky M. Hyperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J*. 2004;10(1):24-30.
54. Caovilla HH, Ganança MM, Munhoz MSL, Ganança FF, Serafini F. Síndromes cocleovestibulares e hiperinsulinismo. *RBM Otorrinolaringol*. 1994;1(1):90-8.
55. Ramos S, Ramos RF. Síndromes cócleo-vestibulares por distúrbios do metabolismo dos glicídios. Tratamento com dietas nutricionais e evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 1993;59(2):112-20.
56. Rao G. Insulin resistance syndrome. *Am Fam Physician*. 2001;63(6):1159-63, 1165-6.
57. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
58. Knowler WC, Barret-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New Engl J Med*. 2002;346(6):393-403.
59. Portmann M, Le Bert G, Aran JM. Potentiels cochléaires obtenus chez l'homme en dehors de toute intervention chirurgicale. Note préliminaire. *Rev Laryng*. 1967;88(3):157-64.
60. Margolis RH, Rieks D, Fournier EM, Levine SE. Tympanic electrocochleography for diagnosis of Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;121(1):44-55.
61. Soares LCA, Conegundes LSO, Fukuda C, Munhoz MSL. Da eletrococleografia transtimpânica com e sem hydrops endolinfático e limiares auditivos iguais ou maiores que 50 decibéis. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(1):74-81.

62. Chung WH, Cho DY, Choi JY, Hong SH. Clinical usefulness of extratympanic electrocochleography in the diagnosis of Meniere's disease. *Otol Neurotol.* 2004;25(2):144-9.
63. Kim HH, Kumar A, Battista RA, Wiet RJ. Electrocochleography in patients with Meniere's disease. *Am J Otolaryngol.* 2005;26(2):128-31.
64. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thomsen J, Balle V, editors. *Otitis media today.* Copenhagen: Kugler; 1997. p. 1-8.
65. Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança MM, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(5):522-7.
66. Lavinsky L, Goycoolea M, Zwetsch I. A ovelha para experimentação e treinamento em cirurgia otológica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2000;66(2):102-7.
67. Lavinsky L, Seibel VAA. Detailed histologic, anatomic and morphometric study of the middle ear in sheep to establish a new experimental model. In: Takasaka T, Yuasa R, Hozawa K, editors. *Recent advances in otitis media.* Sendai: Monduzzi; 2001. p. 231-5.
68. Lavinsky L, et al. Sheep: an experimental animal model for research in otology. *Annals of American the Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery Annual Meeting & Oto Expo; 2006; Toronto, Canada.*
69. Soares HB. O estudo histológico do osso temporal do ovino – uma contribuição para a caracterização da ovelha como modelo animal para treinamento e investigação experimental em otologia [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

70. Seibel VA. Estudo anatômico e morfométrico do osso temporal da ovelha com o objetivo da realização de cirurgia experimental e treinamento em cirurgia otológica. [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
71. Seibel VA. Estudo anatômico e morfométrico da orelha interna através da tomografia computadorizada [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
72. Seibel VA, Lavinsky L, Irion K. Comparação morfométrica da orelha interna entre ovinos e humanos através da tomografia computadorizada. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(3):370-6.
73. Maia FCZ. Modificações das emissões otoacústicas por produtos de distorção durante a hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
74. Durrant JD, Ferraro JA. Potenciais auditivos evocados de curta latência: eletrococleografia e audiometria de tronco encefálico. In: Musiek FE, Rintelmann WF, orgs. *Perspectivas atuais em avaliação auditiva.* São Paulo: Manole; 2001. p. 193-238.
75. Lehrer JF, Poole DC, Seaman M, Restivo D, Hartmann K. Identification and treatment of metabolic abnormalities in patients with vertigo. *Arch Intern Med.* 1986;146(8):1497-500.
76. Hall JE, Brands MW, Zappe DH, Dixon WN, Mizelle HL, Reinhart GA, et al. Hemodynamic and renal responses to chronic hyperinsulinemia in obese, insulin-resistant dogs. *Hypertension.* 1995;25(5):994-1002.
77. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbido. *RBM Otorrinolaringol.* 2000;7(1):8-12.

78. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(3):362-6.
79. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005;112(17):2735-52.

9. ANEXO

Tabela 3. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 1 (grupo intervenção) nos minutos 0 a 90.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	123	2,91	9,3
10	116	818,9	9,1
20	107	401,9	7,6
30	98	178,5	5,1
40	89	76,53	4,6
50	82	35,33	3,6
60	74	17,35	3,4
70	69	10,38	3
80	70	6,29	1,3
90	68	4,92	1,6

PA = potencial de ação neural.

Tabela 4. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 2 (grupo intervenção) nos minutos 0 a 90.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	119	1,24	12,5
10	113	532,1	12,3
20	101	218,5	8,6
30	87	121,2	7
40	75	66,8	6,3
50	64	25,7	5,4
60	57	14,6	5,1
70	5x	14,2	4,4
80	44	9,3	3,8
90	39	5,5	1,3

PA = potencial de ação neural.

Tabela 5. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 3 (grupo intervenção) nos minutos 0 a 90.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	145	4,45	9,5
10	139	1.000	9,6
20	125	806,4	8
30	112	404,6	5,2
40	98	212	4,8
50	86	104,5	4
60	76	59,1	3,8
70	68	34,6	3,2
80	62	22,3	1,6
90	57	15,7	1,3

PA = potencial de ação neural.

Tabela 6. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 4 (grupo controle) nos minutos 0 a 90.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	105	2,00	5,0
10	104	2,04	3,9
20	103	2,16	6,5
30	104	2,32	8,8
40	104	2,43	15,2
50	104	2,60	12,0
60	104	4,59	12,3
70	104	2,73	12,2
80	103	2,07	7,5
90	106	2,41	5,7

PA = potencial de ação neural.

Tabela 7. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 5 (grupo controle) nos minutos 0 a 90.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	121	7,62	9,6
10	121	7,53	7,4
20	117	2,34	6,2
30	120	6,73	10
40	116	8,28	13,8
50	113	9,71	13,7
60	111	9,99	13,6
70	107	9,31	13,8
80	103	8,07	13,1
90	107	2,07	13,7

PA = potencial de ação neural.

Tabela 8. Valores de glicemia, insulinemia e potencial de ação neural da ovelha 6 (grupo controle) nos minutos 0 a 90.

Tempo (min)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	105	2,6	5,7
10	104	2,36	5,3
20	103	2,45	4,8
30	102	2,91	8,4
40	100	3,15	9,1
50	100	3,84	8,4
60	100	4,09	8,8
70	100	4,69	9
80	101	5,22	8,8
90	100	5,67	8,4

PA = potencial de ação neural.

Tabela 9. Valores médios de glicemia, insulinemia e amplitude do potencial de ação neural nos grupos controle e intervenção.

Tempo (min)	Grupo controle (n = 3)			Grupo intervenção (n = 3)		
	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	110	4,1	6,7	129	2,9	10,4
10	109	4,0	5,5	122	783	10,3
20	107	2,3	5,9	111	475	8,1
30	108	4,0	9,1	99	234	5,8
40	106	4,6	12,7	87	118	5,3
50	105	5,3	11,4	77	55	4,3
60	105	6,2	11,6	69	30	4,1
70	103	5,6	11,7	62	19,7	3,5
80	102	5,1	9,8	58	12,6	2,2
90	104	3,4	9,3	54	8,7	1,4

PA = potencial de ação neural.

10. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA

ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO COCLEAR DURANTE HIPERINSULINEMIA AGUDA PROVOCADA EM MODELO ANIMAL

Roberto D. Angeli¹, Luiz Lavinsky², Alexandre Dolganov³

¹ Programa de Mestrado em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

² Doutor em Otorrinolaringologia. Professor adjunto, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

³ Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Correspondência:

Dr. Roberto D. Angeli

Rua Plínio Brasil Milano, 80 – Bairro Auxiliadora

CEP 90520-000 – Porto Alegre, RS

Fone/Fax: (51) 3337.3460

E-mail: roberto.dihl@terra.com.br

RESUMO

Introdução: Vários estudos têm demonstrado, sob os pontos de vista clínico e experimental, a influência do metabolismo dos hidratos de carbono sobre a função da orelha interna. Muitos desses estudos apontam a hiperinsulinemia como o fator etiológico mais freqüentemente associado a patologias tanto cocleares como vestibulares.

Objetivo: Registrar e analisar as alterações na atividade elétrica coclear, através da eletrococleografia (ECoG) transtimpânica, durante o hiperinsulinismo induzido em um modelo animal.

Materiais e método: Seis ovelhas macho adultas foram divididas em dois grupos de igual tamanho; após anestesia venosa, os animais foram submetidos ao exame de EcoG e à coleta de sangue periférico para determinação de glicemia e insulinemia. No grupo intervenção, foi administrada insulina regular humana (0,1 U/kg). O grupo controle recebeu somente solução fisiológica. A glicemia e a insulinemia foram determinadas simultaneamente ao registro da atividade elétrica coclear a cada intervalo de 10 minutos, por 90 minutos.

Resultados: No grupo submetido à intervenção, houve progressiva redução na amplitude do potencial de ação coclear em relação ao grupo controle ($p = 0,001$).

Discussão: Os resultados podem ser atribuídos à supressão da atividade da enzima (Na^+/K^+)-ATPase na estria vascular. Esse fenômeno compromete a manutenção do potencial endococlear e a posterior despolarização das células ciliadas cocleares assim como das fibras que compõem a porção auditiva do VIII par craniano.

INTRODUÇÃO

Vários estudos demonstram uma elevada prevalência de alterações no metabolismo dos carboidratos em indivíduos portadores de patologias da orelha interna, oferecendo forte evidência, mesmo que indireta, de uma associação entre essas condições clínicas. O hiperinsulinismo tem sido apontado como a alteração metabólica mais freqüente nessa população (1-5). D'Avila e Lavinsky, ao estudar o perfil glicídico e suas correlações com a doença de Ménière, mostraram que 72% dos pacientes tinham graus variáveis de hiperinsulinismo detectáveis no teste de 5 horas de tolerância à glicose (6).

O hiperinsulinismo sem hiperglicemia é considerado uma alteração precoce no metabolismo dos hidratos de carbono (7), podendo preceder o aparecimento da tolerância diminuída à glicose e do diabetes melito não-insulino-dependente (8). Apesar de ser considerado um distúrbio metabólico mais tênue, as repercussões do hiperinsulinismo na orelha interna podem ser marcantes, devido às características iônicas e metabólicas associadas (9).

Estudos sobre o metabolismo revelaram que a orelha interna praticamente não apresenta capacidade de armazenamento energético, dependendo de um suprimento constante de oxigênio e glicose sangüínea (10,11). Sua atividade metabólica, de modo paradoxal, é alta, especialmente na manutenção das concentrações iônicas dos fluidos cocleares (12).

As características iônicas da orelha interna são únicas. O potencial endoclear representa o gradiente de aproximadamente +85 mV observado entre endolinfa e perilinfa, sendo mantido através da secreção ativa de potássio na endolinfa pela estria vascular (13). Estudo conduzido por Mendelsohn e Roderique demonstrou que a indução de hipoglicemia em roedores acarreta importante queda na concentração de potássio endolinfático e conseqüente acúmulo de sódio (14).

A manutenção do potencial endococlear é fundamental no processo de transdução mecano-elétrica, uma vez que a despolarização das células ciliadas internas ocorre a partir da entrada de potássio e cálcio endolinfáticos pelos canais iônicos situados nos seus estereocílios (13).

A exposição a níveis elevados de insulina apresenta repercussões funcionais por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Mangabeira-Albernaz e Fukuda propõem que o hiperinsulinismo bloqueia a atividade da enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria vascular (3), removendo o potássio da endolinfa, retendo sódio e, conseqüentemente, aumentando a pressão osmótica nesse nível, resultando em hidropisia endolinfática (8).

Esses processos de despolarização e repolarização celulares na cóclea e no nervo auditivo têm um padrão reconhecido, sendo o seu registro útil em uma série de situações clínicas na otoneurologia. A eletrococleografia (ECoG) é o método que registra essas variações de potenciais elétricos (15).

A falta de parâmetros objetivos de mensuração e a impossibilidade de se observarem modificações histopatológicas *in vivo* são reconhecidas, por alguns autores, como motivos de discordância em relação ao real impacto dos distúrbios metabólicos no sistema cocleovestibular (16). Partindo da hipótese operacional de que a presença dos distúrbios no metabolismo dos carboidratos interfere negativamente na homeostasia iônica dos fluidos cocleares, repercutindo na sua atividade elétrica e na efetiva condução do sinal acústico pelas vias auditivas, o objetivo do presente estudo foi monitorar a atividade elétrica da cóclea através da ECoG transtimpânica durante a indução aguda de hiperinsulinemia em ovelhas.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo experimental foi conduzido nas dependências da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação da instituição.

A amostra foi constituída de seis (6) ovelhas macho adultas da raça *Corriedale*, com peso entre 40 e 43 kg, divididas randomicamente em dois grupos de igual tamanho. O tamanho da amostra foi calculado fixando-se o valor de alfa em 0,05 e o poder estatístico do estudo em 80%, para detectar uma diferença entre os grupos estimada em pelo menos 3,5 unidades de desvio padrão.

No grupo de estudo ($n = 3$), os animais receberam insulina regular por via endovenosa em bolo (0,1 U/kg diluída em 10 mL de solução salina). Os traçados electrociclográficos foram obtidos no tempo 0 (zero) e de 10 em 10 minutos até um total de 90 minutos, simultaneamente à coleta sanguínea para a dosagem de glicose e insulina séricas. No grupo controle ($n = 3$), cada animal recebeu 20 mL de solução salina por via endovenosa. Da mesma forma, a atividade elétrica foi registrada no tempo 0 e de 10 em 10 minutos até o tempo total de 90 minutos, assim como a coleta sanguínea para a dosagem de glicose e insulina.

Para a sedação, utilizou-se acepromazina a 1%, 500 mg/kg intramuscular. Na indução anestésica, empregou-se tiopental sódico a 15 mg/kg endovenoso. Para a manutenção da anestesia, utilizou-se tiopental sódico a 600 mg/h em infusão contínua em bomba (B-Braum, Nutrimat II).

Dez minutos após a pré-medicação, a anestesia era induzida, e o animal era intubado com tubo traqueal nº 8 a 9 acoplado a carro de anestesia com sistema fechado (Modulus 4000, Narcosul) e fornecimento de oxigênio a 100%. Foram monitorados os

parâmetros anestésicos de saturação de oxigênio, pulso cardíaco (BIOX 3700e, Ohmeda), volume corrente e frequência respiratória (Takaoka, Venticare).

Para a retificação do conduto auditivo externo e exposição da membrana timpânica, foi necessária incisão endo-pré-auricular de cerca de 2 cm, realizada com bisturi elétrico após anestesia local com cloridrato de bupivacaína (Figura 1). Este procedimento permitiu a colocação de um otocone adaptado a partir de uma almotolia plástica (Figura 2), através da qual o eletrodo principal era inserido na orelha média em direção ao promontório.

As coletas de sangue periférico foram realizadas através do acesso venoso periférico, no tempo 0 e a cada 10 minutos até 90 minutos. A glicose foi medida 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). As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

O registro dos potenciais evocados auditivos foi realizado pelo sistema Morfeu All-In-One, desenvolvido por Dolsch Instrumentação Biomédica, de Porto Alegre (RS). A análise dos registros foi realizada através do *software* Clampfit 9.2, desenvolvido pela Axon Instruments.

O método utilizado foi o transtimpânico com eletrodo de inserção (Medelec, código N53159), com área de 0,07 mm, em contato com a mucosa do promontório. O eletrodo secundário foi colocado na mucosa nasal.

O estímulo acústico era fornecido através de microfone colocado junto ao meato acústico externo com intensidade de 110 decibéis de nível de pressão sonora (dBNPS). Os demais parâmetros estão descritos na Tabela 1 (15).

RESULTADOS

Durante a etapa de experimentação, não houve perda de nenhum animal. O protocolo anestésico mostrou-se seguro e efetivo. O método proposto promoveu hiperinsulinemia e hipoglicemia (Figura 3).

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão. O registro do potencial de ação coclear (PA) foi apresentado em *folds*, ou seja, razão dos valores observados nos diferentes momentos pela medida basal. A análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas foi aplicada aos valores de PA e glicemia. Os dados basais foram comparados entre os dois grupos pelo teste *t* de Student para amostras independentes. O nível de significância foi de $\alpha = 0,05$.

Os dados foram analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 12 e apresentados graficamente com o programa SigmaPlot versão 8.0.

A atividade elétrica coclear foi obtida nos seis animais (Figuras 4 e 5). O PA foi a atividade predominante. O potencial de somação, entretanto, não foi obtido em todos os animais.

No que tange a insulinemia, glicemia e amplitude do PA, os dois grupos foram considerados semelhantes no momento basal, com os respectivos valores de $p = 0,59$, $0,14$ e $0,11$. Ao avaliarmos as curvas de registro do PA por ANOVA de medidas repetidas, observou-se que o grupo intervenção apresentou uma queda estatisticamente significativa na amplitude do PA em relação ao grupo controle ($p = 0,001$).

DISCUSSÃO

O conceito de que o hiperinsulinismo isolado (com euglicemia ou mesmo com hipoglicemia reacional) representa a primeira etapa no desenvolvimento da tolerância

diminuída à glicose e do diabetes melito não-insulino-dependente abriu um vasto campo de pesquisa acerca das suas repercussões clínicas.

O impacto dos estados hiperinsulinêmicos na orelha interna se deve às suas características iônicas e metabólicas, de modo especial na estria vascular, estrutura responsável pela secreção de potássio na endolinfa e pela geração e manutenção do potencial endococlear.

Com o objetivo de demonstrar e compreender melhor a relação entre as alterações metabólicas descritas e os mecanismos que levam ao desenvolvimento de patologias labirínticas, vários trabalhos têm sido desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Otologia e Otoneurologia do HCPA (6,17,18), com resultados que convergem com aqueles publicados por outros grupos no Brasil (3,16) e no exterior (19).

Este projeto experimental teve como objetivo identificar e analisar, através de ECoG transtimpânica, alterações na atividade elétrica coclear após a indução de hiperinsulinismo agudo em um modelo animal, fornecendo, desta forma, subsídios para uma compreensão mais adequada dos reais efeitos dessa alteração metabólica na função auditiva.

Para demonstrar as alterações na atividade coclear após a indução aguda de hiperinsulinismo induzido, foi empregado o protocolo de infusão de insulina regular humana na dose de 0,1 U/kg. O protocolo atingiu o objetivo de promover a hiperinsulinemia e a hipoglicemia desejadas.

Desde o estudo pioneiro de Lavinsky et al. (20), o emprego de ovinos como modelo de experimentação animal tem sido adotado por este grupo de pesquisa, sendo caracterizado como uma excelente opção para o treinamento cirúrgico e a investigação experimental na área da otoneurologia (21,22).

Na Unidade de Experimentação, os animais demonstraram ser dóceis e de fácil manuseio. Além disso, suas dimensões permitiram o uso do mesmo instrumental cirúrgico usado em humanos. Após a recuperação anestésica, os animais foram encaminhados ao seu local de origem, sem a necessidade de acondicionamento em gaiolas ou similares. Finalmente, as ovelhas apresentaram uma excelente cicatrização tecidual.

O tamanho da amostra foi estabelecido a partir de análises estatísticas minuciosas que, frente à magnitude do efeito encontrado, identificaram como adequado o número de seis animais divididos em dois grupos de igual tamanho. Considerando os aspectos éticos envolvidos, decidiu-se pelo encerramento da etapa de experimentação tão logo esse número de animais fosse alcançado.

O protocolo anestésico foi seguro e efetivo, não havendo nenhum óbito. O sucesso foi devido, entre outros fatores, à sua execução sempre sob as mesmas condições materiais e humanas e através de capacitada equipe médico-veterinária, com larga experiência no manejo de ovinos.

Durante a experimentação, para a exposição da membrana timpânica, foi fundamental a realização de incisão endo-pré-auricular, conforme já descrito (Figura 1). O canal auditivo dos ovinos é longo e tortuoso, e os otocones usados em humanos não se adaptam às suas características anatômicas. A solução encontrada foi original e efetiva, através da ponteira de uma almotolia plástica, facilmente encontrada no meio hospitalar (Figura 2).

Em relação ao método de aferição da audição, a ECoG demonstrou ser um exame de fácil execução e baixo custo. A técnica transtimpânica capta a atividade elétrica muito próximo à sua origem, proporcionando um sinal de muito boa qualidade. O desconforto gerado pela timpanotomia foi mínimo, considerando que o traumatismo é pequeno e que os animais encontravam-se sob efeito anestésico adequado.

Na ausência de parâmetros eletrococleográficos prévios, decidiu-se pelo uso do *toneburst*, e não do clique de banda larga ou *broad band click*. Inicialmente, foi realizada uma “varredura” de frequências para determinar em quais delas haveria respostas evocadas consistentes. Foram utilizadas as frequências entre 5 e 10 kHz.

Os traçados obtidos representaram alterações de voltagem geradas na cóclea e no nervo auditivo e correspondem às etapas de despolarização e polarização celular ou, em última instância, ao transporte iônico pela membrana da célula. Como essa atividade exige um intenso gasto energético, sendo suscetível à interferência das concentrações de insulina e glicose plasmáticas, a ECoG representa um papel promissor na pesquisa experimental acerca das repercussões cocleares dessas dismetabolopatias.

Os valores laboratoriais absolutos demonstraram uma variação muito maior da insulinemia em relação à glicemia, sugerindo que os efeitos decorrentes da exposição foram secundários principalmente ao hiperinsulinismo e, em menor grau, à hipoglicemia, conforme demonstrado por Mangabeira-Albernaz e Fukuda (3).

A resposta elétrica mais evidente foi a progressiva diminuição na amplitude do PA neural observada no grupo intervenção. Esse efeito decorre da incapacidade da fibra neural em despolarizar-se e, assim, transmitir o estímulo acústico. A diminuição dessa atividade pode ser explicada por dois possíveis mecanismos:

- Numa primeira hipótese, o hiperinsulinismo atua diretamente nas fibras que compõem o nervo, comprometendo o transporte iônico pela membrana celular e impedindo a sua despolarização.
- Uma segunda alternativa sugere que o hiperinsulinismo atua na estria vascular, comprometendo a manutenção do potencial endococlear e, desta forma, a despolarização das células ciliadas. A supressão desse potencial se reflete, então, na etapa subsequente de despolarização celular da fibra neural.

Na ausência de um modelo teórico que justifique a neuropatia periférica como consequência do hiperinsulinismo agudo, acreditamos que o efeito dessa situação foi coclear, e o resultado efetivamente medido apenas espelhou tal condição. Em recente estudo conduzido por Maia (17), com delineamento semelhante ao empregado no presente estudo, a atividade coclear de ovinos foi medida através das otoemissões acústicas por produtos de distorção e se mostrou significativamente reduzida após a indução de hiperinsulinismo, corroborando a existência de um efeito predominantemente coclear, e não neural.

O bloqueio da atividade da enzima (Na^+/K^+)-ATPase na estria vascular parece ser o modelo que justifica os achados do presente estudo. Esse efeito modifica a composição iônica da endolinfa, impedindo a despolarização das células ciliadas internas.

O hiperinsulinismo mais acentuado ocorreu no tempo 10 em todos os animais. A amplitude do PA apresenta uma queda progressiva, que inicia no tempo 10 mas se torna muito mais acentuada nos minutos finais do experimento. Essa falta de sincronismo entre o período de maior hiperinsulinismo e o período de menor amplitude do PA se explica, teoricamente, pelo fato de que o bloqueio na ação da enzima (Na^+/K^+)-ATPase acarreta um efeito mais tardio nas concentrações de potássio endolinfático, restando ainda, nos minutos iniciais, moléculas suficientes para a despolarização celular.

A resistência insulínica tem sido exaustivamente estudada dentro de um contexto cardiovascular, mas muito pouco associada a patologias da orelha interna. Considerando os achados dos estudos desenvolvidos por este e outros grupos de pesquisa, podemos considerar que a resistência à insulina deve sempre ser suspeitada em indivíduos com patologias da orelha interna que não sejam justificadas por outras causas. Assim, a curva

glico-insulinêmica deve estar presente dentro da gama de exames laboratoriais solicitados na etapa de investigação diagnóstica.

Dentro dessa realidade, havendo suspeita clínica de hiperinsulinismo com hipoglicemia reacional, esta ocorre geralmente 3 horas após a sobrecarga oral de glicose. Assim, o emprego da curva glico-insulinêmica de 5 horas aumenta o valor preditivo positivo do teste, conforme confirmado por Lavinsky et al. (18).

O manejo dietético para indivíduos com manifestações na orelha interna secundárias a alterações metabólicas envolve uma dieta hipoglicídica e hiperprotéica desenvolvida por Updegraff e Koniz (23) e adaptada para o nosso meio por Ramos e Ramos (24). A eficácia do manejo já foi demonstrada por vários autores (25,26).

Um conceito recente em relação ao manejo dietético de pacientes com resistência à insulina e outras formas de alteração no metabolismo dos carboidratos envolve a quantificação do **índice glicêmico** (27). Alimentos com alto índice glicêmico têm uma elevada velocidade de absorção e conversão em glicose, elevando o pico insulinêmico após a ingestão. A hipoglicemia pode advir quando a glicose ingerida for totalmente metabolizada, permanecendo os efeitos hipoglicemiantes da insulina.

A presença de patologia da orelha interna pode ser entendida, então, como um indicador precoce da presença de alterações no metabolismo dos hidratos de carbono, o que justifica a sua investigação clínica na prática diária.

CONCLUSÃO

O estudo da atividade elétrica coclear através da ECoG em ovelhas durante a indução de hiperinsulinemia aguda revelou significativas alterações eletrofisiológicas, evidenciadas pela redução da amplitude do potencial de ação da porção auditiva do VIII

par craniano. O mecanismo provável desse resultado é o bloqueio da atividade da enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na estria vascular, comprometendo a manutenção do potencial endococlear e a despolarização das células ciliadas internas.

REFERÊNCIAS

1. Updegraff WR. Impaired carbohydrate metabolism and idiopathic Meniere's disease. *Ear Nose Throat J.* 1977;56(4):160-3.
2. Proctor CA. Abnormal insulin levels and vertigo. *Laryngoscope.* 1981;91(10):1657-62.
3. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.
4. Kirtane MV, Medikeri SB, Rao P. Blood levels of glucose and insulin in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1984;406:42-5.
5. Kazmierczak H, Doroszevska G. Metabolic disorders in vertigo, tinnitus, and hearing loss. *Int Tinnitus J.* 2001;7(1):54-8.
6. D'Avila C, Lavinsky L. Glucose and insulin profiles and their correlations in Ménière's disease. *Int Tinnitus J.* 2005;11(2):170-6.
7. Kraft JR. Detection of diabetes mellitus in situ (occult diabetes). *Lab Med.* 1975;6:10-22.
8. D'Ávila C, Lavinsky L. Tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos com repercussão na orelha interna. In: Lavinsky L, editor. *Tratamento em otologia.* Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 373-7.
9. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes.* 1979;28(12):1039-57.
10. Morizane I, Hakuba N, Shimizu Y, Shinomori Y, Fujita K, Yoshida T, et al. Transient cochlear ischemia and its effects on the stria vascularis. *Neuroreport.* 2005;16(8):799-802.

11. Yamamoto H, Makimoto K. Sensitivity of the endocochlear potential level to cochlear blood flow during hypoventilation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109(10 Pt 1):945-51.
12. Kuijpers W, Bonting SL. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated ATPase. XXIV. Localization and properties of ATPase in the inner ear of the guinea pig. *Biochim Biophys Acta.* 1966;173(3):477-85.
13. Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol.* 2006;576(Pt 1):11-21.
14. Mendelsohn M, Roderique J. Cationic changes in endolymph during hypoglycemia. *Laryngoscope.* 1972;82(8):1533-40.
15. Ferraro JA, Krishnan G. Cochlear potentials in clinical audiology. *Audiol Neurootol.* 1997;2(5):241-56.
16. 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):801-6.
17. Maia FCZ. Modificações das emissões otoacústicas por produtos de distorção durante a hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
18. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbido. *RBM – Otorrinolaringol.* 2000;7(1):8-12.
19. Lehrer JF, Poole DC, Seaman M, Restivo D, Hartmann K. Identification and treatment of metabolic abnormalities in patients with vertigo. *Arch Intern Med.* 1986;146(8):1497-500.

20. Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança MM, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(5):522-7.
21. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thomsen J, Balle V, editors. *Otitis media today.* Copenhagen: Kugler; 1999. p. 1-8.
22. Lavinsky L, Goycoolea M, Zwetsch I. A ovelha para experimentação e treinamento em cirurgia otológica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2000;66(2):102-7.
23. Updegraff WR, Koniz M. Nutrition and its relationship to vertigo problems. Presented at the Continuing Medical Education Symposium, St. Francis Hospital; 1977 Mar 31-Apr 1; Poughkeepsie, USA.
24. Ramos S, Ramos RF, Rodrigues VM. Adaptação da dieta hipoglicídica e hiperprotéica de Updegraff, W.R., Koniz, M. para pacientes disglucêmicos. *Acta AWHO.* 1986;2-7.
25. Lavinsky L, Oliveira MW, Bassanesi HJ, D'Avila C, Lavinsky M. Hyperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J.* 2004;10(1):24-30.
26. Ramos S, Ramos RF. Síndromes cócleo-vestibulares por distúrbios do metabolismo dos glicídios. Tratamento com dietas nutricionais e evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993;59(2):112-20.
27. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(3):362-6.

Tabela 1. Parâmetros eletrococleográficos

Tipo	Toneburst
Taxa	10/seg
Repetições	3.000
Polaridade	Condensação
Amplificação	100.000
Filtros	15-15.000 Hz
Frequências estimuladas	5, 6, 7, 8, 9, 10 kHz

Tabela 2. Valores médios de glicemia, insulinemia e amplitude do potencial de ação neural nos grupos controle e intervenção

Tempo (min)	Grupo controle (n = 3)			Grupo intervenção (n = 3)		
	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)	Glicemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	PA (mV)
0	110	4,1	6,7	129	2,9	10,4
10	109	4,0	5,5	122	783	10,3
20	107	2,3	5,9	111	475	8,1
30	108	4,0	9,1	99	234	5,8
40	106	4,6	12,7	87	118	5,3
50	105	5,3	11,4	77	55	4,3
60	105	6,2	11,6	69	30	4,1
70	103	5,6	11,7	62	19,7	3,5
80	102	5,1	9,8	58	12,6	2,2
90	104	3,4	9,3	54	8,7	1,4

PA = potencial de ação neural.

Legendas das figuras

Figura 1. Incisão cirúrgica endo-pré-auricular para melhor exposição da membrana timpânica.

Figura 2. Otocone adaptado ao meato auditivo externo.

Figura 3. A) Média dos níveis de insulina e B) média dos níveis de glicose nos grupos intervenção e controle a cada 10 minutos, durante 90 minutos.

Figura 4. Traçados eletrococleográficos obtidos no grupo intervenção.

Figura 5. Traçados eletrococleográficos obtidos no grupo controle.

Figura 6. Médias observadas nos grupos intervenção e controle para razão (*fold*) do potencial de ação coclear em relação ao momento basal e níveis de glicemia.

Figura 1



Figura 2



Figura 3A

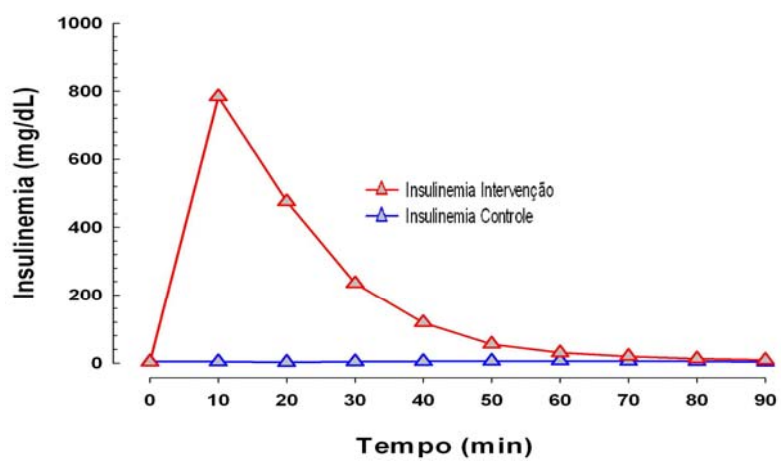


Figura 3B

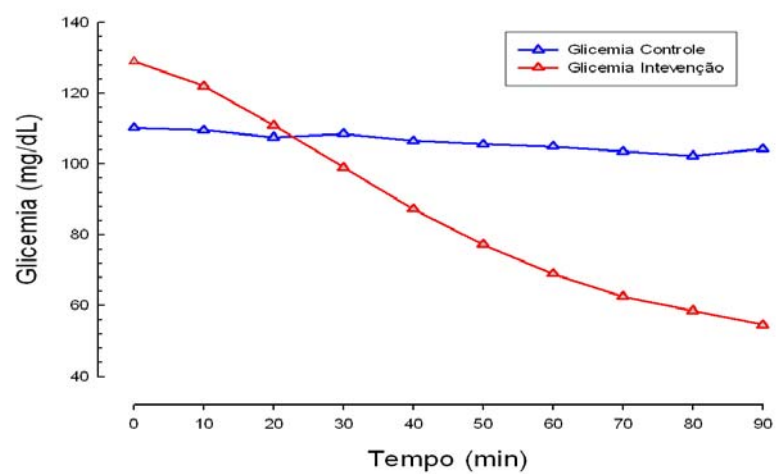


Figura 4

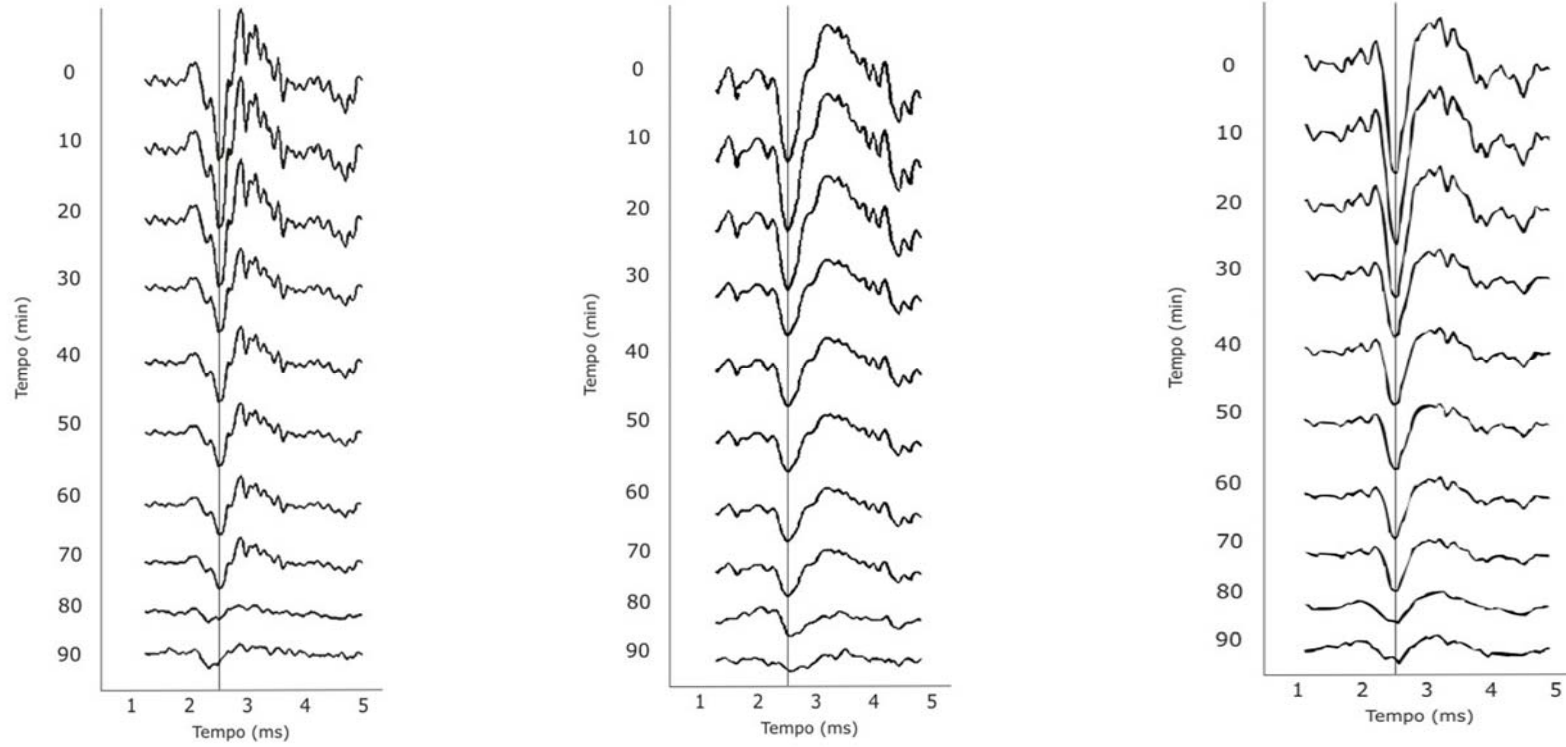


Figura 5

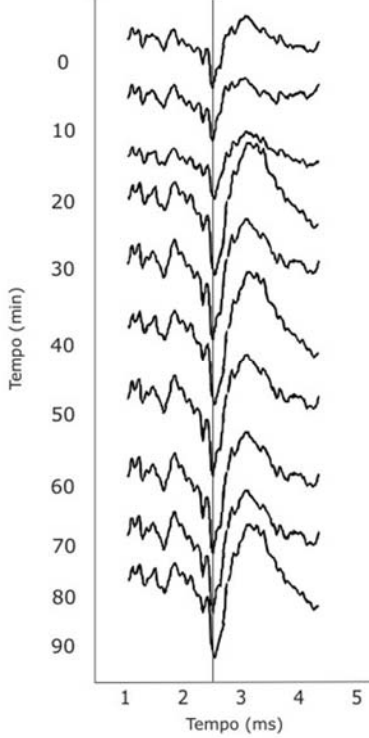
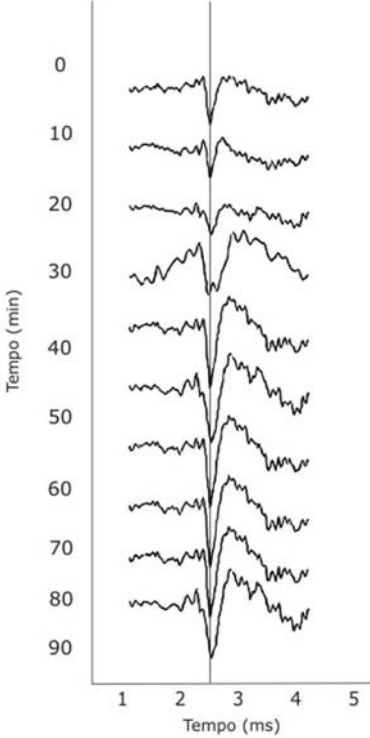
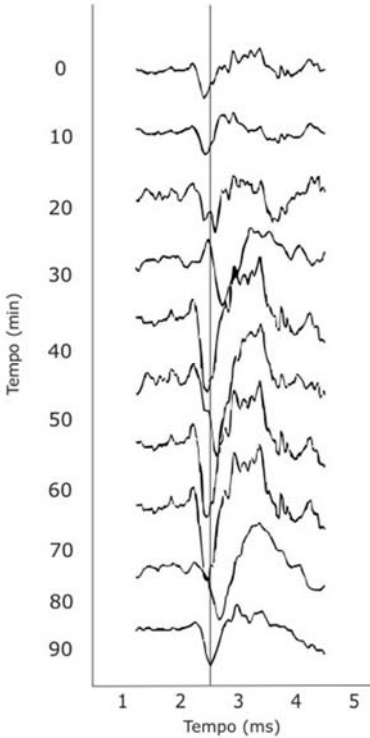
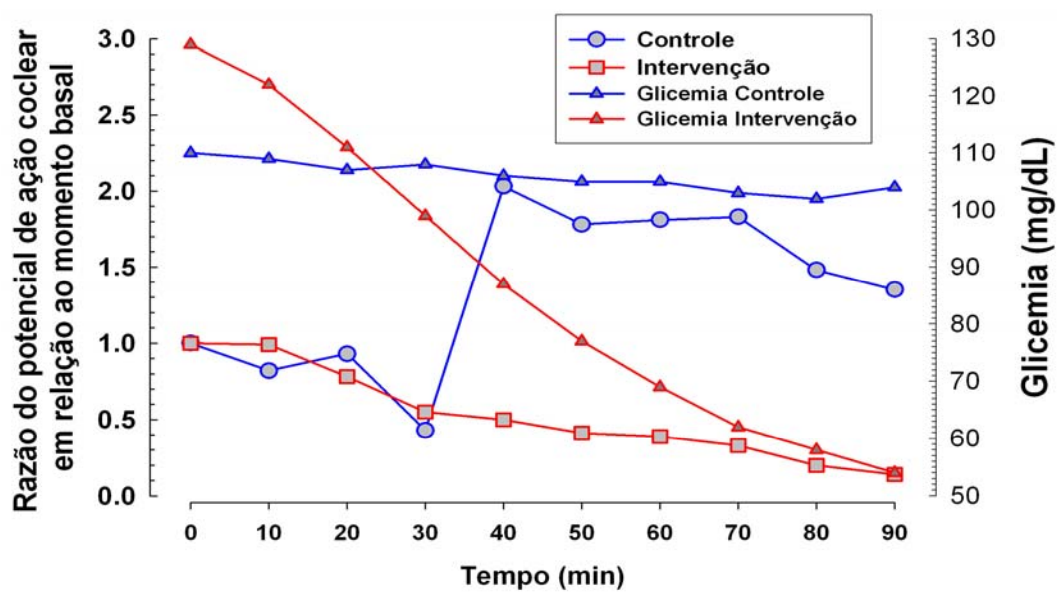


Figura 6



11. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

ALTERATIONS TO COCHLEAR FUNCTION DURING INDUCED ACUTE HYPERINSULINEMIA IN AN ANIMAL MODEL

Roberto D. Angeli,¹ Luiz Lavinsky², Alexandre Dolganov³

¹ Graduate Medical School: Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² PhD in Otorhinolaryngology. Associate professor, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Neurosciences Laboratory, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

This research was carried out at the Research Center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence:

Dr. Roberto D. Angeli

Rua Plínio Brasil Milano, 80 – Bairro Auxiliadora

CEP 90520-000 – Porto Alegre, RS – Brazil

Phone/Fax: +55 (51) 3337.3460

E-mail: roberto.dihl@terra.com.br

ABSTRACT

Introduction: Several different studies have demonstrated the influence of carbohydrate metabolism on inner ear function, from both clinical and experimental perspectives. Many of these studies have identified hyperinsulinemia as the most frequent etiologic factor associated with both cochlear and vestibular pathologies.

Objective: To record and analyze alterations in cochlear electrical activity in an animal model during induced hyperinsulinemia, using transtympanic electrocochleography (ECoG).

Materials and methods: Six adult male sheep were divided into two equal groups and, after venous anesthesia, were subjected to ECoG examination and peripheral blood testing for glycemia and insulinemia assay. Regular human insulin IV was administered (0.1 U/kg) to the animals in the intervention group. The control group received saline solution only. Glycemia and insulinemia were assayed simultaneously with cochlear electrical activity recording, every 10 minutes, for 90 minutes.

Results: There was a progressive reduction in the amplitude of cochlear action potential in the intervention group in relation to the control group ($p = 0.001$).

Discussion: These results could be attributed to suppression of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ enzyme activity in the stria vascularis. This phenomenon leads to loss of endocochlear potential and subsequent depolarization of cochlear hair cells and also of the fibers that make up the auditory portion of the VIII cranial nerve pair.

INTRODUCTION

Several different studies have demonstrated an elevated prevalence of carbohydrate metabolism abnormalities in individuals suffering from pathologies of the inner ear, providing strong evidence, if indirect, of a link between these clinical conditions, with hyperinsulinism being indicated as the most frequent metabolic alteration among this population (1-5). D'Avila and Lavinsky, studying glucose profiles and their correlation with Ménière's disease, demonstrated that 72% of their patients had varying degrees of hyperinsulinism detectable by 5-hour glucose tolerance testing (6).

Hyperinsulinism without hyperglycemia is considered an early-stage alteration to carbohydrate metabolism (7), which may precede the emergence of reduced glucose tolerance (RGT) and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) (8). Although considered more tenuously linked with metabolic disorders, repercussions for the inner ear can be marked, as a result of the ionic and metabolic characteristics found there (9).

Studies of its metabolism have revealed that the inner ear has practically no capacity to store energy and is dependent upon a constant supply of oxygen and glucose (10,11). Paradoxically, its metabolic rate is elevated, especially for the maintenance of cochlear fluid ion concentrations (12).

The ionic characteristics of the inner ear are unique. The endocochlear potential is represented by the gradient of approximately +85 mV observed between endolymph and perilymph and maintained by active potassium secretion into the endolymph by the stria vascularis (13). A study conducted by Mendelsohn and Roderique demonstrated that induction of hypoglycemia in rodents results in a significant drop in endolymphatic potassium concentration and consequent sodium accumulation (14).

Maintenance of the endocochlear potential is of fundamental importance to the mechanical-electrical transduction process, since depolarization of inner hair cells takes

place as a result of endolymphatic potassium and calcium entering via the ion channels in their stereocilia (13).

Exposure to elevated insulin levels has functional repercussions, through mechanisms that are not yet fully understood. Mangabeira-Albernaz and Fukuda propose that hyperinsulinism blocks (Na⁺/K⁺)-ATPase enzyme activity within the stria vascularis (3), removing potassium from endolymph, retaining sodium and, consequently, increasing osmotic pressure at that level, resulting in endolymphatic hydrops (8).

This process of cellular depolarization and repolarization in the cochlea and auditory nerve exhibits a recognizable pattern and it is useful to record this activity in a variety of clinical situations within otoneurology. Electrocochleography (ECoG) is the method used to Record these variations in electrical potential (15).

Some authors have identified the lack of objective measurement parameters and the impossibility of observing histopathological changes *in vivo* as reasons for disagreement over the true impact of metabolic disorders on the cochleovestibular system (16). Starting from the operational hypothesis that the presence of carbohydrate metabolism disorders has a negative impact on ionic hemostasis of cochlear fluids, with repercussions for its electrical activity and the effective conduction of the acoustic signal along the auditory pathways, the objective of the present study was to monitor the electrical activity of the cochlea of sheep by means of transtympanic electrocochleography during induction of acute hyperinsulinemia.

MATERIALS AND METHODS

This experimental study was conducted within the grounds of the Animal Experimentation Unit, part of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Research

Center, after approval had been granted by the institution's Research and Post-Graduation Group Research Ethics Committee.

The sample comprised six (6) adult male sheep, Corriedale breed, weighing from 40 to 43 kg, and split into two equal groups at random. Sample size was calculated based on an alpha of 0.05 and statistical power of 80% for the detection of a difference between groups estimated at least 3.5 standard deviations.

Each animal in the control group ($n = 3$) was given 20 ml of intravenous saline. Electrocochleographic traces were plotted at zero and every 10 minutes until 90 minutes had elapsed, simultaneously with blood sampling for serum glucose and insulin assays. Animals in the study group ($n = 3$) were given regular insulin intravenously in bolus (0.1 U/kg diluted in 10 ml of saline). Once more electrical activity was recorded at zero and every 10 minutes until 90 minutes had elapsed, also concurrent with blood samples for glucose and insulin assays.

Sedation was with 500 mg/kg intramuscular acepromazine at 1%. Anesthetic induction was with 15 mg/kg intravenous sodium thiopental, maintained with continuous infusion of 600 mg/h sodium thiopental using a pump (B-Braum, Nutrimat II).

Ten minutes after premedication, anesthesia was induced and animals intubated with a tracheal tube n° 8 to 9 coupled to an anesthesia cart with a closed system (Narcosul, Modulus 4000) and 100% oxygen. The anesthetic parameters oxygen saturation, heart beat (Ohmeda, Biox 3700e), tidal volume and respiratory rate (Takaoka, Venticare) were monitored.

In order to straighten the external auditory canal and expose the tympanic membrane, it was necessary to make a preauricular surgical incision of around 2 cm, with an electric scalpel, after local anesthetic with bupivacaine hydrochloride (Figure 1). This procedure allowed an ear speculum adapted from a plastic nozzle to be fitted (Figure 2),

through which the primary electrode was inserted into the middle ear in the direction of the promontory.

Peripheral blood samples were taken via peripheral venous access, at zero and every 10 minutes thereafter up to 90 minutes. Glucose was measured using the glucose-oxidase enzymatic colorimetric method, using a LABTEST kit. Insulin was measured using electrochemiluminescence immunoassay (Modular Analytics E170, Roche). Analyses were carried out at the clinical pathology laboratory at the HCPA.

Evoked auditory potentials were recorded with a Morfeu All-In-One system, developed by Dolsch Instrumentação Biomédica, Porto Alegre, RS, Brazil. Recording were analyzed using Clampfit 9.2 software, developed by Axon Instruments.

The transtympanic method was employed with an insertion electrode (Medelec, code N53159) with an are of 0.07 mm in contact with the promontory mucosa. The secondary electrode was placed in the nasal mucosa.

Acoustic stimulus was provided by a microphone placed in contact with the external acoustic meatus with an intensity of 110 dB SPL. The remainder of the parameters are described in Table 1 (15).

RESULTS

None of the animals were lost during the experimental phase. The anesthetic protocol proved safe and effective. The method proposed did indeed provoke hyperinsulinemia and hypoglycemia (Figure 3).

Quantitative data have been described in terms of means and standard deviations. Recordings of the cochlear action potential are represented in folds, i.e. the ratios of the observed values at each sample point to the baseline measurements. Analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements was applied to the cochlear action potential and

glycemia values. Baseline data for the two groups were compared using Student's t test for independent samples. The level of significance was defined as $\alpha = 0.05$.

Data were analyzed using SPSS version 12 and presented graphically using SigmaPlot version 8.0.

Cochlear electrical activity was recorded for all 6 animals (Figures 4 and 5). The action potential of the cochlear nerve (AP) was the predominant activity. Summating potential was not, however, obtained in all animals.

At baseline the two groups were considered similar in terms of insulinemia, glycemia and AP amplitude, with respective p values being 0.59, 0.14 and 0.11. When we evaluated the AP curves traced by analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, we found that the intervention group exhibited a statistically significant drop in AP values when compared with the control group ($p = 0.001$).

DISCUSSION

The concept that hyperinsulinism in isolation (with euglycemia or even with hypoglycemia in reaction) represents the first stage in the development of RGT and NIDDM has opened up a vast field of research into the clinical repercussions of this.

The repercussion that hyperinsulinemic states have on the inner ear are due to its ionic and metabolic characteristics, in particular in the stria vascularis, the structure responsible for secreting potassium into the endolymph and for generation and maintenance of endocochlear potential.

With the objective of better demonstrating and so understanding the relationship between the metabolic abnormalities described and the mechanisms that lead to the development of labyrinth pathologies, the Otology and Otoneurology Research Group at the HCPA has undertaken a number of projects in this area of research (6, 17, 18),

obtaining results that are convergent with those published by other Brazilian research groups (3, 16) and internationally (19).

The objective of this experimental project was to identify and analyze alterations in cochlear electrical activity, by means of transtympanic ECoG, after induction of acute hyperinsulinism in an animal model, thereby providing the foundations for a more adequate understanding of the true effects of this metabolic alteration on auditory function.

In order to demonstrate altered cochlear activity after induction of acute hyperinsulinism, a protocol was employed infusing regular human insulin IV at a dosage of 0.1 U/Kg. This protocol achieved its objective of provoking the desired hyperinsulinemia and hypoglycemia.

Since the pioneering study by Lavinsky et al. (20), the use of sheep as animal experimental models has been adopted by this research group, being characterized as an excellent option for surgical training and experimental investigation in this area of otoneurology (21, 22).

Within the Animal Experimentation Center, the animals proved docile and easy to manage. Their size allows the same surgical instrumentation to be used as is for humans. After recovery from anesthesia, they were returned to their original location with no need for conditioning in cages or similar. Furthermore, they exhibited excellent tissue healing.

The sample size was defined based on painstaking statistical analyses, which, based on the magnitude of the observed effect, identified the quantity of 6 animals split into two equal groups. Respecting the ethical considerations involved, it was decided to end the experimental phase as soon as that number of animals had been reached.

The anesthetic protocol was safe and effective, with no deaths occurring. This success was due, among other factors, to anesthesia always taking place under the same

material and human conditions and being performed by a qualified medical-veterinary team with great experience in handling sheep.

During the experiment it was necessary to perform the preauricular surgical incision described earlier (Figure 1) in order to expose the tympanic membrane. The auditory canal is long and tortuous in sheep, and ear specula used with humans do not fit their anatomical characteristics. The solution that was found was both original and effective, using a the nozzle from a plastic squeeze bottle, easily obtained in a hospital environment (Figure 2).

In relation to the method of measuring hearing, ECoG proved an easily executed and low cost examination technique. The transtympanic method captures electrical activity very close to its origin, offering a very high quality signal. The discomfort caused by tympanotomy was minimal, since the trauma is minor and the animals were adequately anesthetized.

In the absence of prior electrocochleographic parameters, it was decided to use toneburst rather than broad band click (BBC). Initially a frequency sweep was performed to determine which provided consistent evoked responses, with frequencies from 5 to 10 kHz being chosen.

The resultant traces represent the changes in voltage generated in the cochlea and auditory nerve and correspond to the stages of cellular depolarization and polarization, or, to go further, ion transport across cell membranes. Since this activity requires intense energy consumption, being susceptible to interference from plasma concentrations of insulin and glucose, ECoG promises to play a role in research into the cochlear repercussions of these dysmetabolopathies.

Absolute laboratory results demonstrated a much greater variation in insulinemia than in glycemia, suggesting that the effects of exposure were secondary principally to

hyperinsulinism and, to a lesser degree, to hypoglycemia, as demonstrated by Mangabeira-Albernaz and Fukuda (3).

The most obvious electrical response was the progressive reduction in neural AP amplitude observed in the intervention group. This effect is the result of the nerve fibers' inability to depolarize and, therefore, to transmit the acoustic stimulus. The reduction in this activity could be explained by two possible mechanisms:

- According to the first hypothesis, hyperinsulinism acts directly on the fibers that comprise the nerve, compromising ion transport by the cell membrane and impeding depolarization.
- A second alternative is that hyperinsulinism acts on the stria vascularis, compromising maintenance of endocochlear potential and, therefore, depolarization of the hair cells. The suppression of this potential is therefore reflected in the subsequent stage of cellular depolarization of nerve fibers.

In the absence of a theoretical model that explains peripheral neuropathy as a consequence of acute hyperinsulinism, we believe that the effect of this condition was on the cochlea, and the result that was actually measured merely mirrors this. In a recent study conducted by Maia (17) the cochlear activity of sheep, measured by means of distortion product otoacoustic emissions, was significantly reduced after induction of hyperinsulinism, in a study design similar to that employed here, corroborating the existence of a predominantly cochlear effect rather than a neural one.

It appears that the model which explains the findings of this study is that the $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ enzyme is blocked in the stria vascularis. This effect modifies the ionic composition of the endolymph, impeding depolarization of the inner hair cells.

The most accentuated hyperinsulinism took place at 10 minutes for all animals. The amplitude of AP exhibits a progressive fall, starting at 10 minutes, but that is much more accentuated at the end of the experiment. This lack of synchronization between the period of greatest hyperinsulinism and the period of lowest AP amplitude is theoretically explained by the fact that blocking the (Na⁺/K⁺)-ATPase enzyme takes longer to have an effect on endolymphatic potassium concentrations, with sufficient molecules for cellular depolarization surviving for the initial minutes.

Insulin resistance has been extensively studied in a cardiovascular context, but rarely in connection with inner ear pathologies. Considering the results of studies carried out by this and other research teams, we can consider that insulin resistance should always be a suspicion in individuals inner ear pathologies that cannot be explained by other causes. therefore, the glycemia-insulinemia curve should be one of the battery of laboratory tests requested during diagnostic investigation.

Against this background, if there is a clinical suspicion of hyperinsulinism with hypoglycemia in response, this generally occurs 3 hours after oral glucose challenge. Thus, the use of a 5-hour glycemia-insulinemia curve increases the positive predictive value of the test, as confirmed by Lavinsky et al (18).

Dietary management of individuals with inner ear manifestations secondary to metabolic alterations involves a low glucose and high protein diet developed by Updegraff and Koniz (23) and adapted for our region by Ramos and Ramos (24). The efficacy of this approach has been duly demonstrated by several authors (25, 26).

A recent concept with relation to the dietary management of insulin-resistant patients and those with other carbohydrate metabolism disorders involves quantifying the glycemic index (GI) of foods (27). Foods with a high GI have a high velocity of absorption and conversion into glucose, which raises peak insulinemia after their consumption.

Hypoglycemia may follow when the glucose consumed has been completely metabolized and the effects of hyperinsulinemia remain.

The existence of an inner ear pathology may therefore be interpreted as an early indicator of the presence of alterations to carbohydrate metabolism, which justifies its clinical investigation in daily practice.

CONCLUSIONS

This study of cochlear electrical activity by means of electrocochleography of sheep during induced acute hyperinsulinemia revealed significant electrophysiological alterations, as demonstrated by the reduction in the action potential amplitude of the auditory portion of the VIII cranial nerve pair. The mechanism responsible is probably a blockade of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ enzyme activity in the stria vascularis, compromising the maintenance of endocochlear potential and depolarization of inner hair cells.

REFERENCES

1. Updegraff WR. Impaired carbohydrate metabolism and idiopathic Meniere's disease. *Ear Nose Throat J.* 1977;56(4):160-3.
2. Proctor CA. Abnormal insulin levels and vertigo. *Laryngoscope.* 1981;91(10):1657-62.
3. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaryngol.* 1984;97(5-6):496-501.
4. Kirtane MV, Medikeri SB, Rao P. Blood levels of glucose and insulin in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1984;406:42-5.
5. Kazmierczak H, Doroszevska G. Metabolic disorders in vertigo, tinnitus, and hearing loss. *Int Tinnitus J.* 2001;7(1):54-8.
6. D'Avila C, Lavinsky L. Glucose and insulin profiles and their correlations in Ménière's disease. *Int Tinnitus J.* 2005;11(2):170-6.
7. Kraft JR. Detection of diabetes mellitus in situ (occult diabetes). *Lab Med.* 1975;6:10-22.
8. D'Ávila C, Lavinsky L. Tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos com repercussão na orelha interna. In: Lavinsky L, editor. *Tratamento em otologia.* Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p. 373-7.
9. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes.* 1979;28(12):1039-57.
10. Morizane I, Hakuba N, Shimizu Y, Shinomori Y, Fujita K, Yoshida T, et al. Transient cochlear ischemia and its effects on the stria vascularis. *Neuroreport.* 2005;16(8):799-802.

11. Yamamoto H, Makimoto K. Sensitivity of the endocochlear potential level to cochlear blood flow during hypoventilation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109(10 Pt 1):945-51.
12. Kuijpers W, Bonting SL. Studies on (Na⁺-K⁺)-activated ATPase. XXIV. Localization and properties of ATPase in the inner ear of the guinea pig. *Biochim Biophys Acta.* 1966;173(3):477-85.
13. Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol.* 2006;576(Pt 1):11-21.
14. Mendelsohn M, Roderique J. Cationic changes in endolymph during hypoglycemia. *Laryngoscope.* 1972;82(8):1533-40.
15. Ferraro JA, Krishnan G. Cochlear potentials in clinical audiology. *Audiol Neurootol.* 1997;2(5):241-56.
16. 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):801-6.
17. Maia FCZ. Modificações das emissões otoacústicas por produtos de distorção durante a hiperinsulinemia provocada aguda em modelo animal [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
18. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbido. *RBM – Otorrinolaringol.* 2000;7(1):8-12.
19. Lehrer JF, Poole DC, Seaman M, Restivo D, Hartmann K. Identification and treatment of metabolic abnormalities in patients with vertigo. *Arch Intern Med.* 1986;146(8):1497-500.

20. Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança MM, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol.* 1999;119(5):522-7.
21. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thomsen J, Balle V, editors. *Otitis media today.* Copenhagen: Kugler; 1999. p. 1-8.
22. Lavinsky L, Goycoolea M, Zwetsch I. A ovelha para experimentação e treinamento em cirurgia otológica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2000;66(2):102-7.
23. Updegraff WR, Koniz M. Nutrition and its relationship to vertigo problems. Presented at the Continuing Medical Education Symposium, St. Francis Hospital; 1977 Mar 31-Apr 1; Poughkeepsie, USA.
24. Ramos S, Ramos RF, Rodrigues VM. Adaptação da dieta hipoglicídica e hiperprotéica de Updegraff, W.R., Koniz, M. para pacientes disglucêmicos. *Acta AWHO.* 1986;2-7.
25. Lavinsky L, Oliveira MW, Bassanesi HJ, D'Avila C, Lavinsky M. Hyperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. *Int Tinnitus J.* 2004;10(1):24-30.
26. Ramos S, Ramos RF. Síndromes cócleo-vestibulares por distúrbios do metabolismo dos glicídios. Tratamento com dietas nutricionais e evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993;59(2):112-20.
27. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(3):362-6.

Table 1. Electrocochleographic parameters

Type	Toneburst
Rate	10/sec
Repetitions	3000
Polarity	Condensation
Amplification	100,000
Filters	15-15000 Hz
Frequencies stimulated	5, 6, 7, 8, 9, 10 kHz

Table 2. Mean glycemia, insulinemia and amplitude of neural action potential for control and intervention groups

Time (min)	Control group (n = 3)			Intervention group (n = 3)		
	Glycemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	AP (mV)	Glycemia (mg/dL)	Insulinemia (mg/dL)	AP (mV)
0	110	4.1	6.7	129	2.9	10.4
10	109	4.0	5.5	122	783	10.3
20	107	2.3	5.9	111	475	8.1
30	108	4.0	9.1	99	234	5.8
40	106	4.6	12.7	87	118	5.3
50	105	5.3	11.4	77	55	4.3
60	105	6.2	11.6	69	30	4.1
70	103	5.6	11.7	62	19.7	3.5
80	102	5.1	9.8	58	12.6	2.2
90	104	3.4	9.3	54	8.7	1.4

AP = neural action potential AP.

Figure legends

Figure 1. Preauricular surgical incision to better expose the tympanic membrane.

Figure 2. Ear speculum fitted to the external auditory meatus.

Figure 3. A) Mean insulin levels and B) mean glucose levels for intervention and control groups, every 10 minutes for 90 minutes.

Figure 4. Electrocochleographic traces for the intervention group.

Figure 5. Electrocochleographic traces for the control group.

Figure 6. Observed means for the intervention and control groups by cochlear action potential folds, in relation to baseline and glycemia levels.

Figure 1



Figure 2



Figure 3A

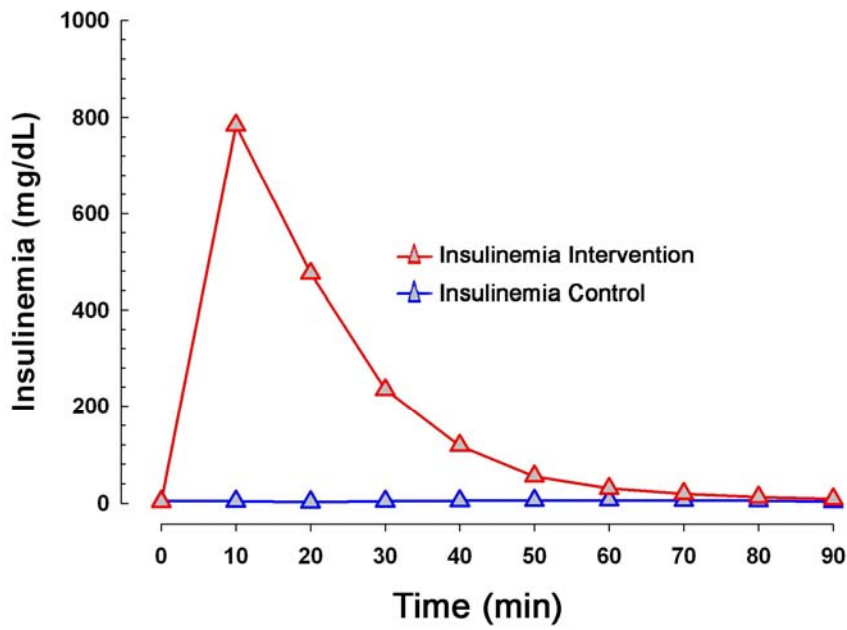


Figure 3B

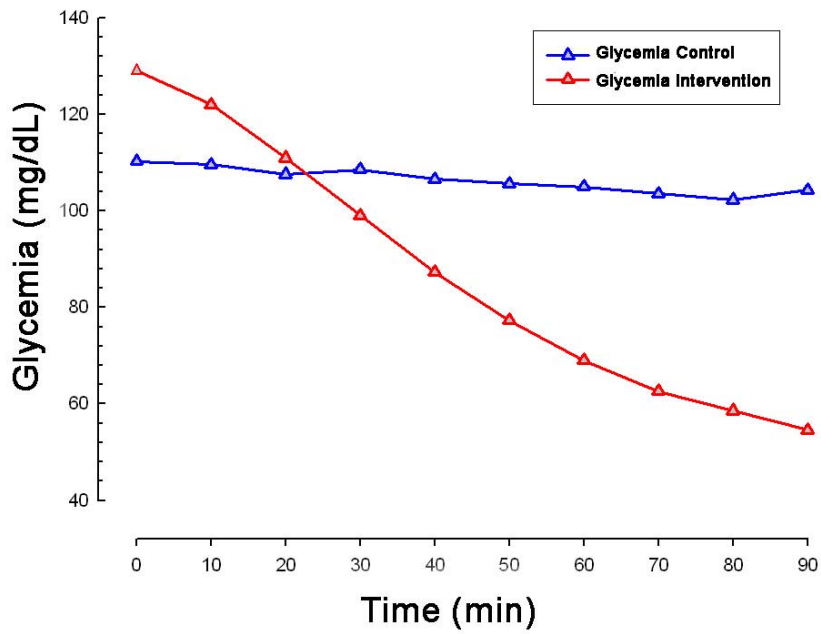


Figure 4

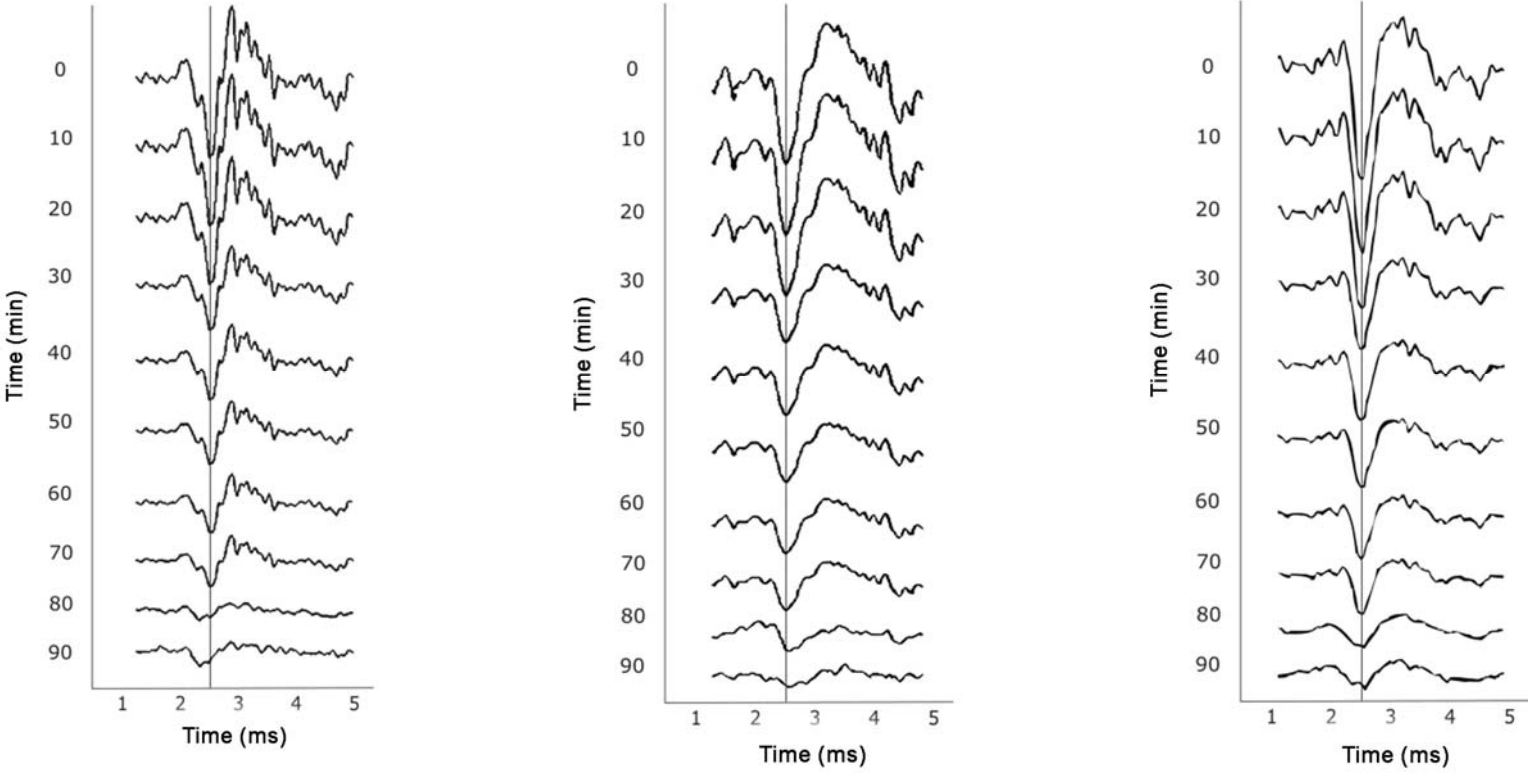


Figure 5

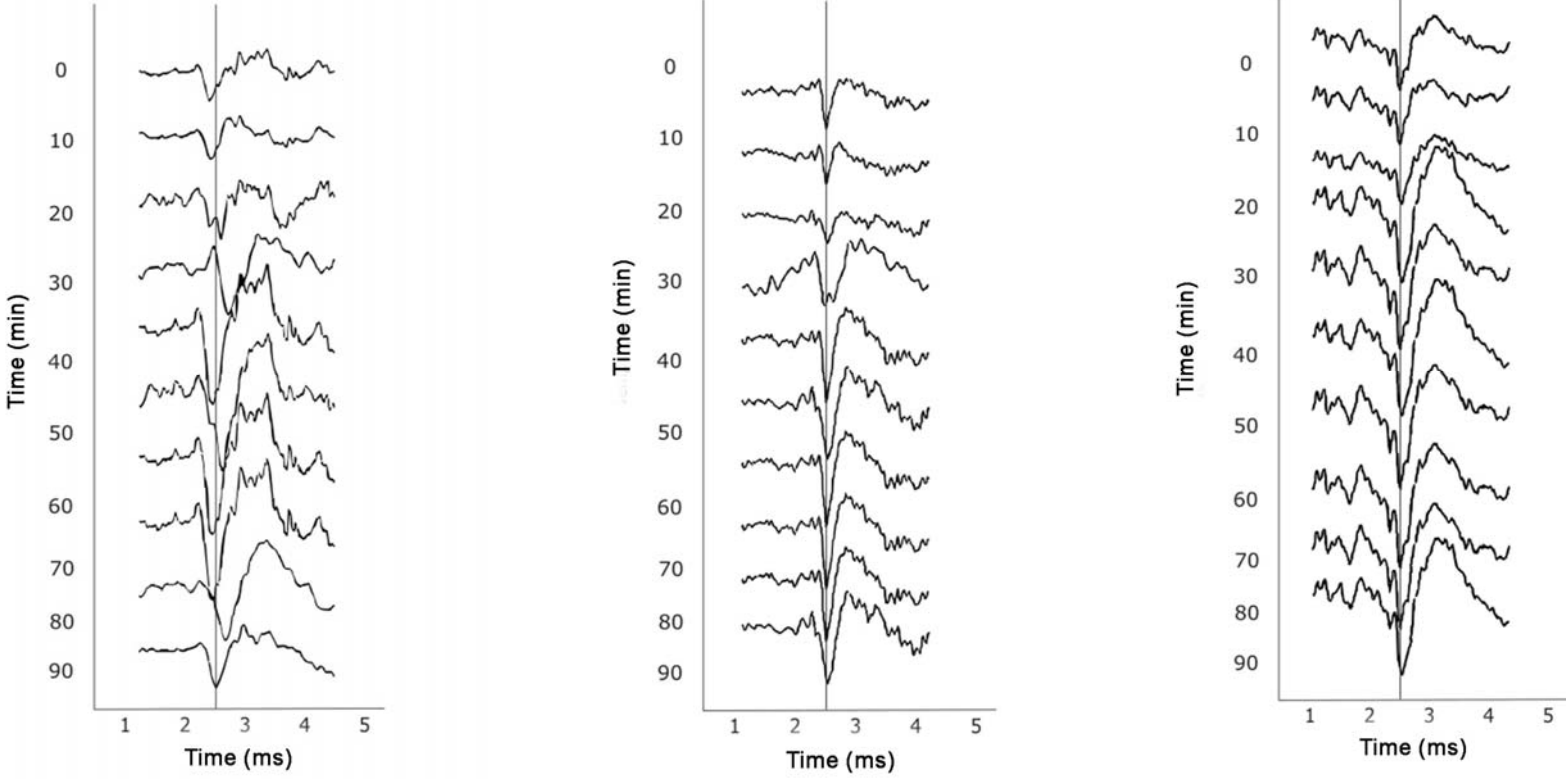


Figure 6

