

Emissões otoacústicas por produtos de distorção em ovinos normais e após indução de hiperinsulinemia

Distortion product otoacoustic emissions in sheep before and after hyperinsulinemia induction

Francisco Carlos Zuma e Maia ¹, Luiz Lavinsky ²,
Roseli Oliveira Möllerke ³, Marcos Eugênio Soares
Duarte ⁴, Daniela Peres Pereira ⁵, Juliana Elert
Maia ⁶

Palavras-chave: emissões otoacústicas, hiperinsulinemia, produtos de distorção.

Keywords: otoacoustic emissions, hyperinsulinemia, distortion product.

Resumo / Summary

As emissões otoacústicas transientes evocadas e as emissões otoacústicas por produtos de distorção vêm assumindo importância significativa na identificação de alterações cocleares. **Objetivo:** Através da monitorização das emissões otoacústicas, registrar os limiares dos produtos de distorção em condições normais e na presença de modificações eletrofisiológicas nas células ciliadas externas cocleares de ovelhas após a indução de hiperinsulinemia aguda. **Material e Método:** Estudo experimental com sete ovelhas no grupo-controle e sete no grupo-estudo. Os níveis de insulina e glicose foram verificados simultaneamente ao registro das emissões otoacústicas por produtos de distorção de 10 em 10 minutos, até o tempo de 90 minutos. O grupo-controle recebeu soro fisiológico, e o grupo-estudo, injeção em bolo de 0,1 U/kg de insulina humana regular. **Resultados:** Houve diminuição significativa nos limiares dos produtos de distorção no grupo-estudo em relação ao grupo-controle nas frequências acima de 1.500 Hz e após o tempo de 60 minutos ($P < 0,001$). **Conclusão:** O estudo permitiu estabelecer os limiares das emissões otoacústicas por produtos de distorção em ovelhas com constante reprodutibilidade, o que mostra que o método é adequado para uso em investigações audiológicas e otológicas. Ficou, ainda, plenamente identificado que o hiperinsulinismo agudo foi capaz de provocar relevantes modificações nestes limiares.

Transient evoked otoacoustic emissions and distortion product otoacoustic emissions have gained significant importance in the identification of cochlear alterations. **Aim:** To record distortion product thresholds through the monitoring of otoacoustic emissions in normal conditions and in the presence of electrophysiologic changes in cochlear outer hair cells in sheep after hyperinsulinemia induction. **Material and methods:** Experimental study, with seven sheep in the control group and seven in the study group. Insulin and glucose concentrations were measured simultaneously for the recording of distortion product otoacoustic emission every 10 minutes, all the way to 90 minutes. The control group received saline solution, and the study group received a bolus injection of 0.1 U/kg of regular human insulin. **Results:** There was a significant reduction in distortion product thresholds in the study group when compared to the control group at frequencies greater than 1,500Hz and after 60 minutes ($P < 0.001$). **Conclusion:** This study established distortion product otoacoustic emission thresholds in sheep with constant reproducibility, demonstrating that the method is adequate for use in audiology and otology investigations. Results also fully confirm that acute hyperinsulinemia may cause important changes in these thresholds.

¹ Mestre, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia - Otorrinolaringologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Doutor em Otorrinolaringologia, Professor Associado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Doutora, Professora de Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴ Graduado em Medicina Veterinária, Veterinário, Centro de Pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵ Graduada em Fonoaudiologia, Fonoaudióloga.

⁶ Acadêmica de Nutrição, Acadêmica de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço para correspondência: Francisco Carlos Zuma e Maia - Rua Ipiranga 95/602 Canoas RS 92010-290.

Tel. (0xx51) 3472-1820 - E-mail: zumaemaia@gmail.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 26 de dezembro de 2006. cod. 3569

Artigo aceito em 10 de fevereiro de 2007.

INTRODUÇÃO

Na década passada, as emissões otoacústicas (EOA) evocadas foram empregadas nos estudos dos aspectos mecânicos da função coclear. Dentre os dois tipos básicos de EOA - transientes evocadas (EOATE) e por produtos de distorção (EOAPD)-, as EOAPD são as mais empregadas na prática clínica, sendo capazes de mostrar alterações cocleares iniciais, as quais não são detectadas na audiometria tonal e em outros testes convencionais, na doença de Ménière e em outras alterações freqüentes da orelha interna.

Existem evidências do envolvimento coclear e vestibular mesmo nos estágios iniciais das alterações metabólicas relacionadas à glicose e insulina¹⁻⁵. Pesquisas em modelo animal focadas nas alterações endococleares têm revelado que a orelha interna praticamente não apresenta energia armazenada, dependendo do suprimento de oxigênio e da perfusão da glicose para manter seu intenso nível de atividade. Portanto, mudanças no metabolismo ou no fluxo sanguíneo têm grande potencial para alterar a homeostase da orelha interna⁶, e o estudo dessas alterações pode, provavelmente, trazer à luz importantes aspectos para explicar a relação entre distúrbios do metabolismo dos glicídios e desordens da orelha interna.

A utilização da ovelha para propósitos experimentais, inicialmente propostos por Lavinsky & Goycoolea⁷ para pesquisa em otologia, resulta de trabalhos prévios do nosso grupo^{8,9}, que revelaram similaridades significativas entre ovelhas e humanos em termos de anatomia, histologia e morfometria da orelha, principalmente em relação ao porte das estruturas. Devido a essa similaridade, as ovelhas são especialmente utilizadas para estudos cirúrgicos e investigação da neurofisiologia otológica.

Partindo da hipótese operacional de que podemos utilizar as EOA nas investigações otológicas em ovelhas, o objetivo do presente estudo foi registrar os limiares dos produtos de distorção, bem como as modificações eletrofisiológicas das células ciliadas externas (CCE) cocleares após interferir metabolicamente na cóclea, ao estabelecer hiperinsulinemia aguda.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo experimental seguiu os princípios internacionais para o manuseio dos animais¹⁰ e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pós-Graduação da instituição de origem (protocolo nº 04-051).

O cálculo do tamanho da amostra foi determinado com base em um estudo-piloto, incluindo três animais no grupo de estudo e três animais no grupo-controle. Os animais que conseguiam atingir índices acima de 50% de reprodutibilidade nas EOA transientes e com presença dos produtos de distorção (PD) no tempo zero do experimento foram incluídos no estudo.

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

Indução de hiperinsulinemia aguda e anestesia

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

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

Após 10 minutos da pré-medicação, o animal era induzido com tiopental, entubado com tubo traqueal de 8-9mm e acoplado a carro de anestesia com sistema fechado (Modulus 4000, Narcosul, Porto Alegre, RS), sendo fornecido oxigênio 100%. Foram monitorados os parâmetros anestésicos de saturação de oxigênio, pulso cardíaco (Biox 3700e, Ohmeda, Louisville, CO, EUA), volume corrente, freqüência respiratória (Ventcare, São Paulo, SP) e temperatura retal (Sontemp 400/700, Sheridan, WY, EUA).

Cirurgia para exposição do meato acústico externo

Foi realizada incisão cirúrgica com bisturi elétrico (BMO-870, Medcir, São Paulo, SP), após bloqueio local com cloridrato de bupivacaína 0,75%, de aproximadamente 2cm endo-pré-auricular, com o objetivo de melhor visualização do meato auditivo externo e da membrana timpânica e colocação da sonda para realização das EOA (Figura 1).

Métodos de registro das EOA

Durante os registros, a temperatura corpórea de cada animal foi mantida em $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por intermédio

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

As respostas das EOATE (Figura 2) foram registradas pelo aparelho da marca Madsen, modelo Capella, acoplado ao notebook Toshiba Satellite. Os parâmetros utilizados foram realizados no modo fast screen, com estímulo (click) de duração de 40 microssegundos (μ s) e intensidade de 80 dB SPL, com polaridade de condensação. Para análise dos dados, consideramos somente os segmentos dos registros na janela de 3 a 12,5ms.

As EOAPD (Figura 3) foram registradas pelo mesmo equipamento utilizado pela EOATE. Os parâmetros utilizados foram de PD1 = 2F1 - F2 (F = frequência do estímulo sonoro), com uma relação F1: F2 = 1,22. Os níveis de intensidade foram de L1 = 65 e L2 = 55 Db (onde L = intensidade do estímulo sonoro). Para análise das EOAPD, utilizamos os limiares de intensidade (dB) das frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000 Hz.

Coleta sanguínea de glicose e insulina

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

Análise estatística

Os dados foram transferidos para um programa estatístico computadorizado - Statistical Package for the Social Science (SPSS), versão 13.0 - para análise. Para o grupo-piloto, foi utilizado o teste t de Student para comparação de dois grupos com magnitude do efeito de dois desvios padrão, $\alpha = 0,05$ e poder de 90%, com uma estimativa de seis animais por grupo.

Durante o experimento, foi realizado o teste binomial para avaliar se a ocorrência de valores mínimos nos limiares dos PD, nas frequências de 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000 Hz, nos tempos de 60, 70, 80 e 90 minutos, foi a mesma entre os grupos controle e estudo.

RESULTADOS

Iniciou-se o estudo com 18 animais. Ao longo do desenvolvimento do experimento, dois animais foram excluídos por razões anatômicas do meato acústico externo, um animal por condições anestésicas desfavoráveis, levando à agitação do animal durante o experimento e resultando no deslocamento da sonda da EOA, e uma morte ocorreu durante a anestesia.

Todos os animais se comportaram de maneira dócil

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



Figura 1. Fixação e adaptação da sonda estável no meato auditivo externo.

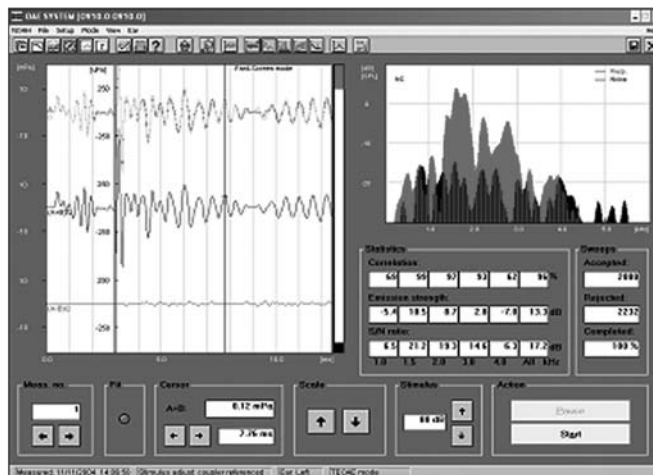


Figura 2. Registro das emissões otoacústicas transientes evocadas em ovelhas no tempo zero.

O método empregado promoveu a hipoglicemia e a hiperinsulinemia desejadas (Figura 4A e Figura 4B).

Não houve modificações nos limiares dos PD no grupo-controle em relação aos níveis de glicose e insulina durante 90 minutos (Figura 5).

Na Figura 6, existe uma diminuição dos limiares dos PD nas frequências de 750 a 8.000 Hz no grupo-estudo, de acordo com o tempo.

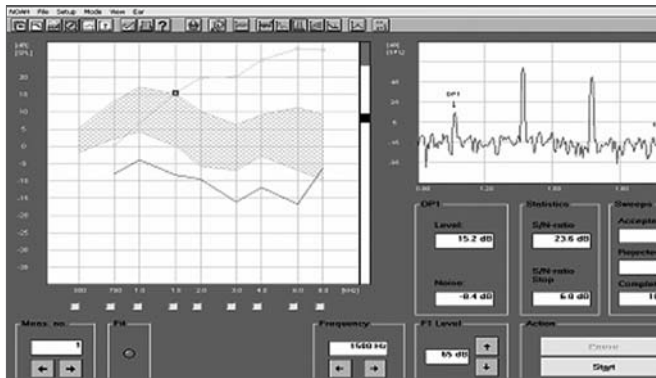


Figura 3. Registro das emissões otoacústicas por produtos de distorção em ovelhas no tempo zero.

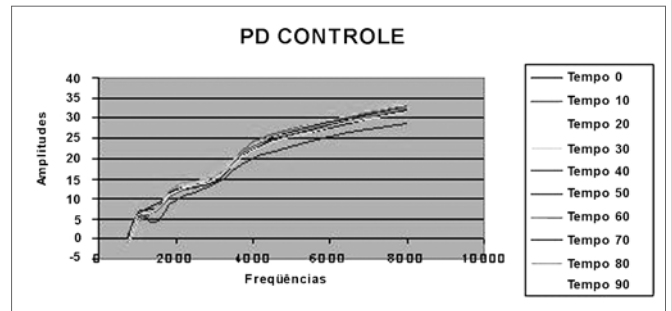


Figura 5. Média dos níveis das emissões otoacústicas por produtos de distorção no grupo-controle durante 90 minutos. PD = produtos de distorção.

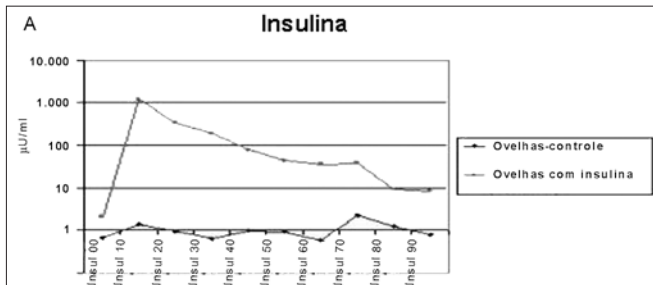


Figura 4A. Média dos níveis de insulina nos grupos controle e estudo durante 90 minutos.

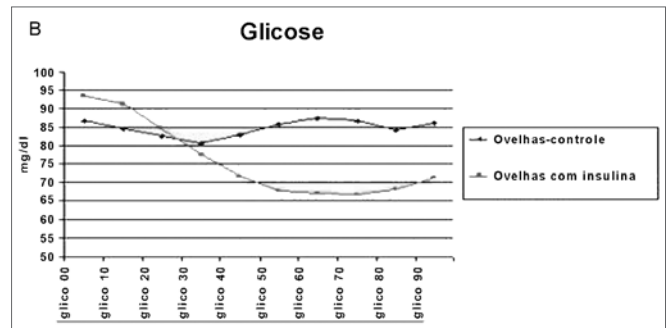


Figura 4B. Média dos níveis de glicose nos grupos controle e estudo durante 90 minutos.

Tabela 1. Valores mínimos para os produtos de distorção em quatro tempos (min) de registro após a injeção de insulina no grupo-estudo nas oito frequências (Hz) estudadas^a.

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

^a Teste binomial para a ocorrência homogênea de valores mínimos entre os grupos controle (n = 7) e estudo (n = 7) (P < 0,001).

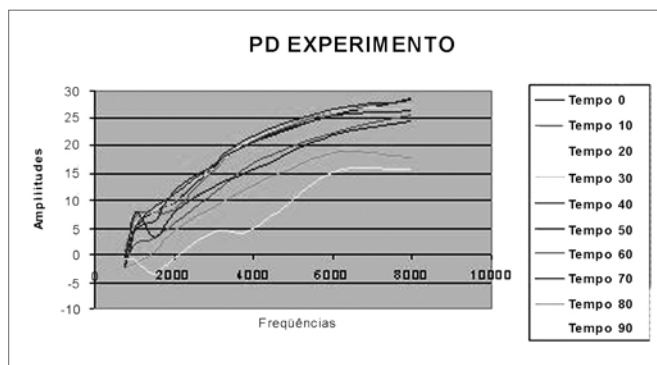


Figura 6. Média dos níveis das emissões otoacústicas por produtos de distorção no grupo-estudo durante 90 minutos. PD = produtos de distorção.

A Tabela 1 mostra os limiares mínimos observados para os PD em quatro tempos, a partir de 60 minutos de registro após a injeção de insulina no grupo-estudo, nas oito frequências (Hz) estudadas.

DISCUSSÃO

Inúmeras são as técnicas que podem ser utilizadas para monitorar a função auditiva. As EOATE e EOAPD, como representantes das condições de funcionamento das CCE, são testes de aplicação clínica recente e vêm assumindo importância significativa na identificação de alterações cocleares, principalmente por se tratar de um exame objetivo, não-invasivo e de fácil aplicação^{11,12}. Mesmo não determinando o limiar auditivo e não substituindo a audiometria tonal, a imitanciometria ou a audiometria de tronco encefálico, esses novos exames podem detectar sinais iniciais de danos cocleares¹³.

Na amostra utilizada no grupo-controle, neste trabalho, obtiveram-se respostas das EOAPD em todos os animais. Este achado confirma o fato - já amplamente demonstrado em várias pesquisas, como, por exemplo, as de Robles et al.¹⁴ em chinchilas e as de Schrott¹⁵ em camundongos - de que as EOAPD estão presentes em ouvidos normais, porquanto as células ciliadas do órgão de Corti, quando saudáveis, geram os PD. Também em humanos, Lopes Filho¹⁶ e Coube¹⁷ obtiveram respostas do EOAPD em 100% dos ouvidos testados.

Devemos destacar o fato de que, durante os 10 registros executados em cada animal do grupo-controle, observamos uma permanente reprodutibilidade dos achados, mostrando que os resultados são confiáveis e, ainda, que os mesmos permitem estabelecer um conceito de padrão de normalidade para este estudo em ovinos.

Os animais atualmente utilizados para o desenvolvimento de pesquisa e treinamento, como cães, gatos e macacos, têm um porte distinto do homem e são de difícil manuseio no biotério, por serem agressivos e suscetíveis a doenças. Além disso, muitas vezes esses animais são caros

e pouco disponíveis; muitos são animais de estimação, e seu uso para treinamento e pesquisa pode determinar repercussões psicossociais e causar conflitos com sociedades protetoras de animais⁷. Por sua rusticidade, disponibilidade, docilidade, resistência e baixo custo, as ovelhas são animais especialmente adequados para treinamento e experimentação em otologia. Outros trabalhos⁷⁻⁹ mostram semelhanças significativas entre a anatomia, a histologia e a morfometria das orelhas da ovelha e dos seres humanos, principalmente em relação ao porte das estruturas, o que facilita o estudo de ordem cirúrgica, bem como os relacionados com aferições da neurofisiologia otológica. As características e vantagens do uso desse animal puderam ser comprovadas igualmente em nosso estudo. O mesmo aparelho utilizado em humanos pode ser aplicado em ovelhas sem necessidade de adaptações, em comparação com experimentos com cobaias de pequeno porte.

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

No presente estudo, a exposição do meato auditivo externo por meio de uma incisão endo-pré-auricular foi de fundamental importância para a visualização da membrana timpânica e para a perfeita adaptação e vedação do meato acústico externo, através da boa fixação da sonda durante o teste das EOA, garantindo, assim, o monitoramento coclear (10 registros em cada animal), sem qualquer interferência durante todo o experimento, das frequências 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000Hz, resultando numa constância na qualidade do registro e, em consequência, numa homogeneidade nos resultados. Alguns estudos em ratos¹⁸ não conseguiram uma boa fixação da sonda, não permitindo os registros dos EOAPD abaixo de 4.000 Hz.

Apesar de ser um teste objetivo, a amplitude das EOAPD tem mostrado grande variabilidade de indivíduo para indivíduo, provavelmente devido aos diferentes parâmetros de estímulos empregados por cada investigador, como: intensidade dos estímulos primários, diferença ou não entre eles e razão entre as frequências primárias, além das características individuais de cada orelha, possível influência do sistema nervoso central e presença de outros tipos de EOA.

Existem controvérsias quanto às intensidades ideais a serem empregadas em F1 e F2. Hauser & Probst¹⁹ sugerem que fixar L2 menor do que L1 deve resultar na melhora da relação sinal-ruído e aumentar a detectabilidade das respostas de pequenas amplitudes nas orelhas humanas. Estudos em animais apontam que os níveis primários são mais efetivos quando L1 é 5-10 dB maior que L2. Dessa maneira, utilizando os parâmetros de estimulação de PD1 = 2F1 - F2, com uma relação F1: F2 = 1,22, níveis de

intensidade de L1 = 65 e L2 = 55 dB e normatização do aparelho Madsen, modelo Capella, conseguimos registrar, pela primeira vez, o perfil dos limiares de EOAPD (DP-gram) em ovelhas (grupo-controle).

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

A amplitude das respostas captadas nas EOAPD apresentou uma tendência de crescimento em direção às altas freqüências. Em comparação com estudos em humanos¹⁷ e em modelos animais^{18,19}, também mostraram, em orelhas normais, uma configuração da função da EOAPD mais ou menos semelhante à aqui relatada. É possível que a distribuição tonotópica coclear facilite essa maior amplitude em agudos, uma vez que estes estão localizados na base da cóclea, região proximal ao local de captação das EOA. Gorga et al.²⁰ sugerem alguns fatores como responsáveis pelas baixas respostas em estímulos de baixas freqüências. Um deles seria a baixa relação sinal/ruído para as freqüências graves; outro fator seria o modo de transferência de energia pelo sistema da orelha média, que apresenta menor amplificação para graves. Ainda segundo o autor, essa característica da orelha média interfere na transmissão dos graves, tanto na direção da orelha média para a cóclea (estímulo) quanto na direção inversa, da cóclea para a orelha média (resposta). O conjunto desses fatores parece fazer com que as medidas das EOAPD captadas na altura do meato acústico externo apresentem amplitudes menores em baixas freqüências, tornando difícil a distinção entre as emissões e o ruído de fundo.

Vários autores conseguiram reduzir a amplitude das EOAPD em cobaias, alguns provocando hidropisia endolinfática experimental por obliteração do ducto e saco endolinfático²¹, outros²² utilizando microinjeções repetitivas de endolinfa artificial.

No nosso estudo, utilizamos a hiperinsulinemia para modificar eletrofisiologicamente as CCE cocleares. Para demonstrar a gênese dos danos cocleares durante essa condição de hiperinsulinemia aguda, lançamos mão do protocolo de injeção em bolo de 0,1 U/kg de insulina regular, tal como a empregada na técnica do teste de tolerância à insulina²³, onde é avaliada a taxa de redução da glicose ao longo de 15 minutos após a injeção de insulina. Nosso estudo permitiu obter uma resposta apropriada para promover a hipoglicemia e a hiperinsulinemia desejadas. As médias dos valores obtidos nas análises das concentrações plasmáticas de glicose e insulina, no nosso grupo-controle,

foram as mesmas encontradas na literatura veterinária^{24,25} utilizando kit comercial empregado em humanos.

O presente estudo permite considerar relevantes os seguintes aspectos:

- Não houve variações nos limiares dos PD no grupo-controle, em relação aos níveis de insulina e glicose nos 10 registros de cada animal e durante os 90 minutos do experimento, mantendo-se estáveis as características do DP-gram, que passa a ser nosso padrão de normalidade em ovelhas.

- No grupo-estudo, houve uma diminuição significativa nos limiares dos PD em relação ao grupo-controle, diminuição esta que foi bem mais nítida nas freqüências acima de 1.500 Hz e após 60 minutos ($P < 0,001$). Esse dado permite inferir que houve alterações eletrofisiológicas nas CCE, principalmente na espira basal da cóclea.

As CCE são responsáveis pela amplificação sonora de uma freqüência específica, num processo denominado eletromotilidade, resultante das mudanças dos fluidos nas membranas das CCE. Portanto, é possível que os achados deste estudo sejam resultantes da ação da insulina de forma aguda e elevada, e que, após 60 minutos, ela comece a influir na eletromotilidade das freqüências altas e nos padrões iônicos do espaço endolinfático.

Embora as correlações entre as alterações fisiológicas na cóclea e os distúrbios metabólicos dos carboidratos sejam difíceis de se estabelecer, as EOAPD podem eventualmente se tornar o meio para esse fim. Futuros estudos serão necessários para esclarecer a presente observação de uma significativa mudança eletrofisiológica nos limiares dos PD nas altas freqüências, após 60 minutos de hiperinsulinemia aguda induzida.

CONCLUSÃO

Em síntese, as emissões otoacústicas nos animais em estudo tiveram, no grupo controle, uma constante reprodutibilidade dos limiares dos produtos de distorção durante todas as aferições nos mesmos animais, com um padrão de curva (ascendente) semelhante ao da espécie humana. Sendo assim, o método se mostrou adequado para uso em investigações audiológicas e otológicas. No grupo estudo ficou, ainda, plenamente identificado que o hiperinsulinismo agudo foi capaz de provocar relevantes modificações nesses limiares ($P < 0,001$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Doenças metabólicas da orelha interna. *RBM-Otorrinolaringologia* 1995;2(1):18-22.
2. Lavinsky M, Wolff FH, Lavinsky L. Estudo de 100 pacientes com clínica sugestiva de hipoglicemia e manifestações de vertigem, surdez e zumbido. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2000;7(1):8-12.
3. Mangabeira Albernaz PL, Fukuda Y. Glucose, insulin and inner ear pathology. *Acta Otolaringol* 1984;97(5-6):496-501.
4. Ramos S. Labirintopatias por distúrbios do metabolismo dos glicídios: evolução dos sintomas e limiares auditivos tonais com uso de dieta

-
- nutricional [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1987.
5. Lavinsky L, Oliveira MW, Bassanesi HJ, D'Avila C, Lavinsky M. Hyperinsulinemia and tinnitus: a historical cohort. In *Tinnitus J*. 2004;10(1):24-30.
 6. Fukuda Y. Glicemia, insulinemia e patologia da orelha interna [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1982.
 7. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thompson J (eds.): *Otitis media today*. Copenhagen; 1997. p. 1-8.
 8. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico do osso temporal da ovelha com o objetivo da realização de cirurgia experimental e treinamento em cirurgia otológica [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina; 2000.
 9. Seibel VAA. Estudo anatômico e morfométrico da orelha interna: através da tomografia computadorizada [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina; 2004.
 10. American Physiological Society. Guiding principles in the care and use of animals. Disponível em: <http://www.the-aps.org/publications/journals/guide.htm>. Acessado em 20/10/2005.
 11. Kemp DT, Ryan S, Bray P. A guide to the effective use of otoacoustic emissions. *Ear Hear* 1990;11(2):93-105.
 12. Hauser R, Probst R. The influence of systematic primary-tone level variation L2-L1 on the acoustic distortion product emission 2f1-f2 in normal human ears. *J Acoust Soc Am* 1991;89(1):280-6.
 13. Carnicelli MVF. O uso das emissões otoacústicas no diagnóstico e prevenção da perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR). In: Nudemann AA, Costa EA, Seligman J, Ibanez RN. *Perda auditiva induzida por ruído*. Porto Alegre: Bagagem Comunicação; 1997. p. 237-45.
 14. Robles L, Ruggero MA, Rich NC. Two-tone distortion in the basilar membrane of the cochlea. *Nature* 1991;349(6308):413-4.
 15. Schrott A, Puel JL, Rebillard G. Cochlear origin of 2f1-f2 distortion product otoacoustic emissions. *Ear Hear* 1990;11:144-54.
 16. Lopes Filho O, Carlos R, Redondo MC. Produtos de distorção das emissões otoacústicas. *Rev Bras Otorrinolaringol* 1995;61(6):485-94.
 17. Vono Coube CZ, Costa Filho OA. Emissões otoacústicas evocadas: produtos de distorção em indivíduos com audição normal. *Rev Bras Otorrinolaringol* 1998;64(4):339-46.
 18. Hatzopoulos S, Petruccioli J, Laurell G, Previati M, Martini A. Electrophysiological findings in Sprague-Dawley rat induced by moderate dose carboplatin. *Hear Res* 2003;182(1-2):48-55.
 19. Hauser R, Probst R. The influence of the primary-tone level variation L2-L1 on the otoacoustic distortion product emission 2f1-f2 in normal human ears. *J Acoust Soc Am* 1991;89(1):280-6.
 20. Gorga MP, Neely ST, Ohlrich B, Hoover B, Redner J, Peters J. From laboratory to clinic: a large scale study of distortion product otoacoustic emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. *Ear Hear* 1997;18(6):440-55.
 21. Ikino CMY, Bittar RSM, Sato KM, Capella NM. Hidropisia endolinfática experimental sob ação de inibidor da óxido nítrico sintase tipo II: avaliação com emissões otoacústicas e eletrococleografia. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(2):151-7.
 22. Valk WL, Wit HP, Albers FW. Rupture of Reissner's membrane during acute endolymphatic hydrops in the guinea pig: a model for Meniere's disease? *Acta Otolaryngol* 2006;126(10):1030-5.
 23. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Atheros* 2002;13(2):42-9.
 24. Stumpf W, López J. Efeito da dieta na concentração ruminal de ácido propiónico e níveis plasmáticos de glicose e insulina. *Anais da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*; 2000. Viçosa, Brasil.
 25. López J, Stumpf J. Influência do grão de sorgo como fonte de amido em ovinos alimentados com feno. *Parâmetros plasmáticos*. *Rev Bras Zootec* 2000;29(4):1183-90.