

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA
PRÓPOLIS VERMELHA SOBRE O ZUMBIDO INDUZIDO POR
SALICILATO DE SÓDIO EM ROEDORES**

GREGORINA SILVA RIBEIRO ROCHA

Aracaju
Outubro – 2021

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA PRÓPOLIS
VERMELHA SOBRE O ZUMBIDO INDUZIDO POR SALICILATO
DE SÓDIO EM ROEDORES**

Tese de doutorado apresentado para a defesa, submetido à banca examinadora como requisito para obtenção do título de Doutora em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e Ambiente.

GREGORINA SILVA RIBEIRO ROCHA

**Margarete Zanardo Gomes, pH.D.
Orientadora**

Aracaju
Outubro - 2021

R672e Rocha, Gregorina Silva Ribeiro
Efeitos do extrato hidroetanólico da própolis vermelha sobre o zumbido induzido por salicilato de sódio em roedores / Gregorina Silva Ribeiro Rocha ; orientação [de] PhD. Margarete Zanardo Gomes. – Aracaju : UNIT, 2021.

68 f. : il.

Tese (Doutor em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e ambiente)
- Universidade Tiradentes.

Inclui bibliografia.

1. Zumbido. 2. Audição. 3. Própolis. 4. Antioxidantes. I. Gomes, Margarete Zanardo (orient.). II. Universidade Tiradentes. III. Título.

CDU: 616.28-008.12-092.8

Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB

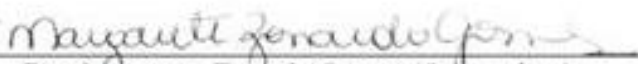
EFEITOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA SOBRE O ZUMBIDO INDUZIDO POR SALICILATO DE SÓDIO EM ROEDORES

Gregorina Silva Ribeiro Rocha

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA A BANCA EXAMINADORA PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

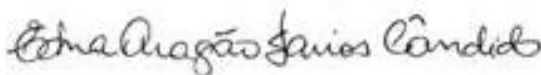
BANCA EXAMINADORA:


Dra. Margarete Zanardo Gomes (Orientadora)


Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior (Examinador Interno)


Dra. Priscila Feliciano de Oliveira (Examinadora Externa)


Dra. Aline Cabral de Oliveira Barreto (Examinadora Externa)


Dra. Edna Aragão Farias Candido (Examinadora Interna)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças e me guiar; a Nossa Senhora por interceder por mim. O percurso foi longo e árduo, mas com a força que recebi de Deus consegui chegar ao destino.

Ao meu esposo, Paulo Gustavo, pelo incentivo, compreensão e por percorrer comigo todas as fases de nossas vidas durante o curso. Aos meus filhos, Bruno e Milena, pelas orações e demonstrações de amor.

Aos meus familiares pelo incentivo e pela alegria com a minha conquista.

A minha orientadora, professora Margarete Zanardo Gomes, por me encorajar a desenvolver o projeto de uma área nova para mim, por me instruir e transmitir seu grande conhecimento profissional. Cresci como pesquisadora com sua orientação!

Ao professor Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e a todos os demais professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente pelos conhecimentos transmitidos nas aulas e as correções nas bancas de acompanhamento. A equipe de profissionais do biotério pela dedicação aos pesquisadores.

Agradeço a fonoaudióloga Priscila Feliciano de Oliveira pela grande ajuda durante todo o percurso até a defesa da tese. O incentivo foi enorme! As fonoaudiólogas Aline Cabral de Oliveira Barreto, pelas contribuições na correção do trabalho, e Milca Teles, pela disponibilidade de seu equipamento na coleta de dados.

Aos amigos Ana Karina Rocha Hora Mendonça, pela parceria desde as aulas do mestrado, Ana Maria Gomes dos Santos, Lorena Emília Sena Lopes e Reinaldo Viana Belo Neto por todos os trabalhos que desenvolvemos juntos. Agradeço também a todos os colegas graduandos, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental. A CAPES, pela bolsa de doutorado.

RESUMO

O zumbido neurossensorial é uma sensação auditiva, cuja patogênese envolve o estresse oxidativo, pois pode promover alteração na morfologia coclear. Como o extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) possui propriedade antioxidante, pode atuar positivamente no tratamento desse sintoma. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre o zumbido induzido por salicilato de sódio em roedores. Fizeram parte do estudo 21 ratos Wistar machos (250 – 300 g) que foram tratados durante quatro dias com EHPV (30 mg/kg; grupo salicilato de sódio/extrato hidroetanólico de própolis vermelha – SS/EHPV) ou veículo (grupo salicilato de sódio/veículo – SS/VC) por via oral, e após uma hora foi administrado salicilato de sódio (350 mg/kg; grupos SS/EHPV e SS/VC) por via intraperitoneal (i.p.). O grupo controle (CTR) foi pré-tratado com água destilada por via oral e recebeu solução salina (i.p.). Testes comportamentais foram realizados para avaliação de sinais de ansiedade e depressão: no terceiro dia os roedores foram submetidos ao teste comportamental campo aberto e ao pré-teste do nado forçado duas horas após a administração do salicilato de sódio (SS) ou solução salina. No quarto dia, 2h após a administração do SS ou solução salina, foram submetidos aos testes comportamentais labirinto em cruz elevado e nado forçado. Também no quarto dia e após a avaliação comportamental foram realizados testes auditivos: timpanometria e emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) e em seguida os roedores foram eutanasiados. As cócleas e os núcleos cocleares dos animais foram retirados para análise histomorfológica por meio da coloração por hematoxilina eosina. Os dados de EOAPD e do teste de nado forçado foram avaliados por meio de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*, enquanto os demais dados foram analisados com o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*. Não foram observadas alterações nas médias de complância e pressão no teste timpanométrico. O grupo SS/EHPV apresentou aumento das amplitudes das EOAPD nas frequências de 6 kHz ($p=0,010$) e 8 kHz ($p=0,002$) em relação ao grupo SS/VC, que por sua vez mostrou valores diminuídos em relação ao grupo CTR. Não houve alteração emocional, semelhante a ansiedade e depressão, nos grupos avaliados. O tratamento com SS resultou em diminuição da atividade motora, significativamente maior nos animais tratados com EHPV, semelhantes ao grupo CTR (exploração horizontal $p=0,04$; exploração vertical $p=0,003$). Na avaliação histomorfológica foi observado atrofia do órgão de Corti e degeneração vacuolar no tecido coclear no grupo SS/VC. O grupo SS/EHPV apresentou hiperplasia das células ciliadas do órgão de Corti, sem alterações histopatológicas. O núcleo coclear do grupo SS/EHPV apresentou aspecto similar ao grupo CTR, com neurônios fusiformes e interneurônios unipolares em escova e granuloso, enquanto o grupo SS/VC apresentou aumento de volume celular dos neurônios, menor quantidade de neurônios unipolares e granuloso em relação ao grupo CTR, além de citoplasma volumoso em neurônios piramidais. Os achados elucidaram alterações compatíveis com zumbido em roedores induzido por SS e efeito protetor do EHPV sobre o sistema auditivo.

PALAVRAS-CHAVE: Zumbido; audição; própolis; antioxidantes.

ABSTRACT

Sensorineural tinnitus is an auditory sensation of which pathogenesis involves oxidative stress as it can promote changes in cochlear morphology. As the hydroethanolic extract of red propolis (HERP) has antioxidant properties, it can have a positive act treating this symptom. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of oral administration of EHPV on sodium salicylate-induced tinnitus in rodents. Twenty-one male Wistar rats (250 – 300 g) were part of the study and x treated for four days with HERP (30 mg/kg; sodium salicylate group/red propolis hydroethanolic extract – SS/HERP) or vehicle (sodium salicylate group /vehicle – SS/VC) orally, and after one-hour sodium salicylate (350 mg/kg; SS/HERP and SS/VC groups) was administered intraperitoneally (i.p). The control group (CTR) was pretreated with distilled water orally and received saline solution (i.p.). Behavioral tests were performed to assess signs of anxiety and depression. On the third day, the rodents were submitted to the open-field behavioral test and forced to swim. They're also pre-tested two hours before, having sodium salicylate (SS) or saline solution administrated. On the fourth day, two hours after administering SS or saline solution, they were submitted to the elevated plus-maze and forced to swim again as a behavioral test. Furthermore, on the fourth day, after the behavioral assessment, auditory tests were performed, such as tympanometry and distortion product otoacoustic emissions (OEADP), and then the rodents were euthanized. The cochleas and cochlear nucleus of the animals were removed for histomorphological analysis using hematoxylin-eosin staining. OEADP and forced swim tests data were evaluated by two-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni post-test, while the other data were analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. There were no changes in compliance and pressure means in the tympanometric test. The SS/HERP group showed increased OEADP amplitudes at frequencies of 6 kHz ($p=0.010$) and 8 kHz ($p=0.002$) about the SS/VC group, which showed decreased values about the CTR group. There was no emotional change, similar to anxiety and depression, in the evaluated groups. Treatment with SS resulted in reduced motor activity, significantly greater in animals treated with HERP, similar to the CTR group (horizontal exploration $p=0.04$; vertical exploration $p=0.003$). The histomorphological evaluation showed atrophy of the organ of Corti and vascular (Seria vascular mesmo?) degeneration in the cochlear tissue in the SS/VC group. The SS/HERP group presented hyperplasia of the Organ of Corti hair cells without histopathological alterations. The cochlear nucleus of the SS/HERP group had an appearance similar to the CTR group, with fusiform neurons and unipolar brush and granular interneurons. In contrast to them, the SS/VC group showed increased neuron cell volume, less number of unipolar and granular neurons, and an increase of voluminous cytoplasm in pyramidal neurons. The findings elucidated alterations compatible with SS-induced tinnitus in rodents and the protective effect of HERP on the auditory system.

KEYWORDS: Tinnitus; hearing; propolis; antioxidants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média de comportamentos exibidos no teste campo aberto 38

Tabela 2 – Média de comportamentos exibidos no teste labirinto em cruz elevado 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da abordagem experimental (Grupo CTR - grupo não lesionado, tratado com água destilada; Grupo SS/VC - grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada; Grupo SS/EHPV - grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg).....	28
Figura 2 – Teste auditivo timpanometria.....	29
Figura 3 - Teste auditivo emissões otoacústicas por produto de distorção.....	30
Figura 4 - Teste comportamental campo aberto.....	30
Figura 5 - Teste comportamental labirinto em cruz elevado.....	31
Figura 6 - Teste comportamental nado forçado.....	32
Figura 7 - Compliância e pressão avaliadas no pré-tratamento encontrada no teste timpanométrico entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo <i>tween</i> 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Teste estatístico <i>Kruskal-Wallis</i> , seguido do pós-teste de <i>Dunn</i>	35
Figura 8 - Compliância e pressão avaliadas no pós-tratamento encontrada no teste timpanométrico entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo <i>tween</i> 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Teste estatístico <i>Kruskal-Wallis</i> , seguido do pós-teste de <i>Dunn</i>	36
Figura 9 - Amplitude encontrada no teste emissões otoacústicas por produto de distorção nas frequências de 6 e 8 kHz pré e no pós-tratamento. Grupos: CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo <i>tween</i> 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). As colunas representam as médias e as barras representam o EPM. Símbolos indicam valores significativamente distintos (* - $p < 0,05$ SS/VC diferente de CTR; ** - $p < 0,01$ SS/VC diferente de CTR; ### - $p < 0,01$ SS/EHPV diferente de SS/VC). Teste estatístico ANOVA <i>Two-Way</i> , seguido de pós-teste de <i>Bonferroni</i>	37
Figura 10 - Médias de explorações horizontal e vertical encontradas no teste comportamental campo aberto entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo <i>tween</i> 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). As colunas representam as médias e as barras representam o EPM. Símbolos indicam valores significativamente distintos (* - $p < 0,05$ SS/VC diferente de CTR; ** - $p < 0,01$ SS/VC diferente de CTR; ### - $p < 0,01$ SS/EHPV diferente de SS/VC). Teste estatístico <i>Kruskal-Wallis</i> , seguido de pós-teste de <i>Dunn</i>	38

Figura 11 - Média do tempo de imobilidade e de nado no teste comportamental nado forçado no pré e no pós-tratamento entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Teste estatístico ANOVA Two-Way, seguido de pós-teste de Bonferroni..... 39

Figura 12 - Secções histológicas transversal do tecido coclear, coradas em HE. Aumentos de 40x nos grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada) e SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada). A: rampa vestibular; B: rampa timpânica; C: órgão de Corti; D: membrana basilar; E: estria vascular. As imagens ilustram a integridade do tecido coclear no grupo CTR e a atrofia do tecido coclear no grupo SS. 40

Figura 13 - Secções histológicas transversal do tecido coclear, coradas em HE (800 x), destacando o órgão de Corti. (A) Grupo CTR exibindo células ciliadas internas (CCI) e externas (CCE) apoiadas na membrana basilar (MB) e em íntima relação com a membrana tectorial (MT). Em destaque corpo celular da membrana basilar exibindo características usuais. (B) Grupo SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada) apresenta atrofia e hipoplasia de células ciliadas (CC-At), com perda da relação com a membrana tectorial (MT). Em destaque corpo celular da membrana basilar exibindo intensa vacuolização consistente com degeneração hidrópica. (C) Grupo SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg) apresentando aparente hiperplasia de células ciliadas (CC-Hp). Em destaque, corpo celular basilar sem degeneração hidrópica importante. 41

Figura 14 - Fotomicrografias representativas de secções histológicas do núcleo coclear dorsal (NCD) de roedores dos grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg) em aumentos de 40x (A, B e C, respectivamente) e 100x (A', B' e C, respectivamente). Em destaque (região tracejada), observa-se características celulares distintas no grupo SS/VC (B", citoplasma volumoso em neurônios piramidais – cabeça de seta sem preenchimento) em relação aos demais grupos (A" e C", presença de neurônios fusiformes característicos – cabeça de seta preta, e ampla rede interneurônios: unipolares em escova – seta preta – e granulosos – setas tracejadas). 42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

3-NP	ácido 3-nitropropiónico
ABTS	ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
CLAE-DAD	detector de arranjos de diodos
Cx26	proteína conexina 26
daPa	DecaPascal
dB NPS	decibel nível de pressão sonora
DI 50	dose letal mediana
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazil
EDTA	ácido etinodiaminotetracético
EGb 761	extrato de Ginkgo biloba
EHPV	extrato hidroetanólico de própolis vermelha
EOAPD	emissões otoacústicas por produto de distorção
FRAP	do inglês <i>Ferric-Reducing Ability of Plasma</i>
HE	hematoxilina e eosina
Hz	Hertz
IC ₅₀	concentração inibitória média
IL-1 β	interleucina 1 beta
iNOS	síntese de óxido nítrico induzível
i.p.	intraperitoneal
JNK	do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KCNQ1	do inglês <i>potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1</i>
kHz	quilo hertz
K ⁺	potássio
MAPK	do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mini-TQ	do inglês <i>Mini Tinnitus Questionnaire</i>
NCD	núcleo coclear dorsal
NF-KB	do inglês <i>factor nuclear kappa B</i>
nNos	síntese de óxido nítrico neuronal
SS	salicilato de sódio
THI	do inglês <i>Tinnitus Handicap Inventory</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UVB	ultravioleta B
VGLUT3	transportador de glutamato vesicular 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 ETIOLOGIA DO ZUMBIDO	15
3.2 FISIOPATOLOGIA DO ZUMBIDO	17
3.3 TRATAMENTO PARA O ZUMBIDO.....	19
3.4 PRÓPOLIS VERMELHA	21
3.5 TESTES AUDITIVOS.....	23
3.5.1 <i>Timpanometria</i>	23
3.5.2 <i>Emissões otoacústicas por produto de distorção</i>	24
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS	24
3.6.1 <i>Campo aberto</i>	24
3.6.2 <i>Labirinto em cruz elevado</i>	25
3.6.3 <i>Nado forçado</i>	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 ENSAIO BIOLÓGICO	26
4.1.1 <i>Materiais</i>	26
4.1.2 <i>Animais</i>	26
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.3 TESTES AUDITIVOS.....	27
4.3.1 <i>Inspeção do meato acústico externo</i>	28
4.3.2 <i>Timpanometria</i>	28
4.3.3 <i>Emissões otoacústicas por produto de distorção</i>	29
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	30
4.4.1 <i>Campo aberto</i>	30
4.4.2 <i>Labirinto em cruz elevado</i>	31
4.4.3 <i>Nado Forçado</i>	31
4.5 DISSECAÇÃO E FIXAÇÃO DA CÓCLEA E DO TRONCO ENCEFÁLICO	32
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	33
4.7 ANÁLISE DE IMAGENS.....	33
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO 1 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL	67

1 INTRODUÇÃO

O zumbido é um sintoma auditivo correlato a sujeitos com perda auditiva ou com limiares auditivos normais. Trata-se de uma sensação auditiva percebida pelo indivíduo não originada do meio externo (FIGUEIREDO; AZEVEDO, 2013a). Observa-se que sujeitos com perda auditiva possuem maior probabilidade de apresentar zumbido (OOSTERLOO *et al.*, 2021), sendo um sintoma comum nas pessoas idosas (STOHLER *et al.*, 2020). Entretanto, música alta e barulho de lazer têm sido frequentemente encontrados entre adolescentes e adultos jovens e são fatores de risco para o desencadeamento do zumbido (PIENKOWSKI, 2021). Oosterloo *et al.* (2021) relatam que um a cada cinco idosos tem queixa de zumbido, enquanto Stohler *et al.* (2020) verificaram que 80% da população com zumbido avaliada tinha mais de 40 anos. Quando se refere a zumbido em adolescentes, Rhee *et al.* (2020) relataram prevalência de 46,5% ao avaliarem 1593 sujeitos.

O zumbido, apesar de ser prevalente como comprometimento auditivo, também pode ser desencadeado por distúrbios neurológicos, dentários, fatores psicológicos, como estresse e ansiedade, além de efeitos colaterais medicamentosos, especialmente a aspirina (MAHMOUDIAN-SANI *et al.*, 2017b; ZIAI *et al.*, 2017). De acordo com Delaney *et al.* (2020) o salicilato, componente ativo do ácido acetilsalicílico, conhecido como aspirina, está presente em medicamentos como agente antipirético, analgésico, anti-inflamatório e pode ser um potencial causador do zumbido. Doses elevadas de salicilato de sódio reduzem a eletromotilidade de células do ouvido interno desencadeando perda auditiva e zumbido (DURANTE, 2013; HOTH, BALJIC, 2017). Além disso, Santos *et al.* (2017) verificaram ativação de neurônios quando encontraram maior expressão de c-fos no núcleo coclear e colículo inferior de roedores submetidos a alta dosagem de salicilato de sódio, sugerindo maior excitabilidade neuronal relacionadas ao zumbido.

Assim, como a causa do zumbido é multifatorial, cada vez mais pessoas sofrem com o sintoma havendo redução da qualidade de vida (DREXLER *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2017) e, em muitos casos, associação com ansiedade e depressão (ZIAI *et al.*, 2017).

Muitas vezes o zumbido é uma sequela de um processo patológico que produziu uma lesão coclear e, como consequência, há uma hiperatividade nas vias auditivas, periférica e/ou central (WANG *et al.*, 2020). Assim, o estresse oxidativo é um fator importante que lesiona o ouvido interno, já que pode promover alteração na morfologia coclear, além da apoptose das células da cóclea (CIORBA *et al.*, 2013; MAHMOUDIAN-SANI *et al.*, 2017a; PETRIDOU *et al.*, 2019). A inibição de proteínas e de transportadores de glutamato associado ao aumento das espécies reativas de oxigênio tem sido relatado como favorável para o desenvolvimento do zumbido (XIONG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020).

Como a fisiopatologia do zumbido ainda não é clara, busca-se avaliar o sujeito individualmente para definir a melhor forma de tratamento de acordo com a suposta causa do sintoma. Sendo assim, há uma busca constante de novos processos terapêuticos e uma das formas de tratamento para o zumbido é o uso de produtos naturais (MAHMOUDIAN-SANI *et al.*, 2017a, b; PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2018), devido a ação antioxidante. De acordo com Caieiro e Marcucci (2010), em avaliação de formulações comerciais para o tratamento do zumbido a base de *Ginkgo biloba*, quando os teores de flavonoides foram mais altos, houve maior atividade antioxidante, pelo teste 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH). Assim, ao neutralizar os radicais livres, o estresse oxidativo no sistema auditivo é minimizado, sendo esta uma alternativa promissora para o tratamento do zumbido.

Nessa proposta se tem a própolis vermelha, um produto natural de origem apícola que exerce ação antioxidante (CABRAL *et al.*, 2009; FROZZA *et al.*, 2013), que pode ser benéfica para o tratamento do zumbido. A ação antioxidante da própolis vermelha se dá, principalmente, em função da alta concentração de compostos fenólicos e flavonóides. Machado *et al.* (2016) encontraram em extrato de própolis vermelha teor fenólico de $300,36 \pm 0,01$ mg EAG/g e teor de flavonoide de $57,60 \pm 0,01$ mg EQ/g. Frozza *et al.* (2013) relataram que a própolis vermelha coletada no estado de Sergipe, Brasil, possui alta propriedade antioxidante capaz de eliminar radicais livres, através de estimulação de enzimas do sistema antioxidante (catalase, superóxido dismutase-SOD). Desta forma, o estresse oxidativo no ouvido interno, causador do zumbido, pode ser minimizado com o uso do extrato da própolis vermelha. Além disso, por ser a própolis vermelha um produto natural característico da região, o estudo contribui para a valorização do seu uso farmacoterapêutico, como também para o desenvolvimento econômico regional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor da administração oral do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) sobre o zumbido induzido por salicilato de sódio em roedores.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a eletromotilidade das células ciliadas da cóclea em roedores com zumbido induzido por SS tratados ou não com EHPV;

Avaliar o comportamento emocional (ansiedade e depressão) e a atividade motora dos animais em estudo, em função dos tratamentos;

Caracterizar o efeito do tratamento com EHPV sobre as alterações morfológicas da cóclea e do núcleo coclear, induzidas pelo SS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia do zumbido

O zumbido é uma sensação auditiva percebida pelo indivíduo, classificado em auditivo, que pode ser gerado por alterações nas orelhas externa e média, cóclea e nas vias auditivas centrais (ESMAILI, RENTON, 2018), e para-auditivo ou somatossensorial, que são sons gerados por estruturas musculares e vasculares percebidos pela cóclea (AHSAN *et al.*, 2015; AFIF *et al.*, 2020).

O sintoma pode ser caracterizado de diversas formas: chiado, apito, cigarra, panela de pressão, motor, grilo, pulsação, papel amassando, bater de asas. Esta descrição feita pelo indivíduo é conhecida por caracterizar o tipo de zumbido (FIGUEIREDO; AZEVEDO, 2013a; COELHO *et al.*, 2020). Além disso, determina-se a localização, que pode ser na cabeça ou nos ouvidos; a duração, que se refere ao tempo em que o zumbido é percebido: constante, intermitente ou flutuante; a frequência, que pode ser grave, média ou aguda; e a intensidade, que corresponde ao volume do zumbido (SANCHEZ; FERRARI, 2004; COELHO *et al.*, 2020).

O zumbido somatossensorial é gerado a partir de alterações musculares na coluna cervical (BOUSEMA *et al.*, 2018), oclusão dentária inadequada (AVOGLIO, 2019), desvios da articulação temporomandibular (BERNHARDT *et al.*, 2011); ou alterações no sistema vascular arterial ou venoso, quando o zumbido é identificado como pulsátil e surge a partir de malformação arterial, alteração do fluxo vascular devido anemia, febre, gravidez (AHSAN *et al.*, 2015; AFIF *et al.*, 2020).

Quando se refere ao zumbido auditivo neurossensorial, na maioria dos casos se desenvolve em consequência de lesões cocleares, como perda de audição decorrente de trauma acústico, presbiacusia ou administração de drogas ototóxicas (LANGGUTH *et al.*, 2013). Porém, alterações de orelha externa, como otite externa e cerume excessivo, e de orelha média, como otosclerose, otite média e colesteatoma, também podem ser causas de zumbido auditivo (ESMAILI, RENTON, 2018; COELHO *et al.*, 2020). De acordo com Manche *et al.* (2016) os fatores etiológicos mais prevalentes que levam ao desenvolvimento de zumbido associado à perda auditiva são otite média, presbiacusia e otosclerose.

O zumbido pode ocorrer em qualquer fase da vida, mas a maior prevalência ocorre em idosos, provavelmente em função da deterioração dos sistemas auditivo e vestibular (AHMAD; SEIDMAN, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005). A prevalência de perda auditiva em idosos acima de 70 anos foi de quase dois terços da população avaliada nos Estados Unidos (LIN *et al.*, 2011) e está associada a presença do zumbido (GIBRIN *et al.*, 2013; MANCHE *et al.*, 2016), porém a literatura é controversa e relata casos em que o sintoma não está associado a

presença de perda auditiva (OLIVEIRA *et al.*, 2015), uma vez que há presença em indivíduos com limiares auditivos normais (ROCHA *et al.*, 2017).

A exposição sonora de forma inadequada, seja em ambiente laborativo ou de lazer, também pode gerar prejuízos auditivos, como a perda auditiva e a presença de zumbido auditivo neurosensorial. Muitas vezes há uma relação entre tempo de exposição ao ruído e zumbido (BHATT *et al.*, 2016). Sujeitos entre 12 e 19 anos usuários de fones de ouvidos foram avaliados quanto aos hábitos e queixas auditivas, e verificou-se presença de zumbido em 33,33% deles. Destacou-se correlação positiva entre o tempo de exposição e presença de zumbido (CORREA *et al.*, 2016). Entretanto, estudos também evidenciam presença de zumbido em trabalhadores expostos a ruído com limiares auditivos dentro da normalidade (BOGER *et al.*, 2016).

O efeito colateral de alguns medicamentos e a toxicidade de outros, como aspirina, diuréticos, aminoglicosídeos e quinina (TREVINO-GONZÁLEZ *et al.*, 2020) também podem desencadear zumbido. É sabido que o salicilato, componente ativo da aspirina, está presente em vários medicamentos como agente antipirético, analgésico, anti-inflamatório e pode ser causador de zumbido (DELANEY *et al.*, 2020). O uso da aspirina é muito difundido no tratamento de osteoartrite, cefaleia e prevenção de tromboembolismo (DURNAS, CUSACK, 1992), porém a overdose do salicilato pode desencadear a percepção do zumbido (DELANEY *et al.*, 2020) em decorrência a toxicidade (CAZALS, 2000). Há estudos que revelam associação entre zumbido e comorbidades como hipertensão arterial e diabetes (GIBRIN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015), possivelmente pelo efeito dos medicamentos utilizados.

Há relatos de efeitos ototóxicos das drogas cloroquina e hidroxicloroquina, usadas para tratamentos de patologias como HIV, lupus, artrite reumatóide e, recentemente, em pacientes com coronavírus SARS-CoV-2 (COVID-19), que causaram danos às estruturas da orelha interna, resultando em perda auditiva, zumbido e/ou tontura. Os sintomas auditivos foram temporários ou permanentes e estavam relacionados a variabilidade no tempo de uso das drogas. Houve casos em que a audição voltou ao normal e outros, que melhorou quanto ao grau, porém foi mantida a perda auditiva (PRAYUENYONG *et al.*, 2020).

A presença de zumbido pode levar a alterações psicoemocionais e seu portador pode desenvolver ansiedade e depressão (PATTYN *et al.*, 2015; ZIAI *et al.*, 2017). Na maioria das vezes é difícil identificar se o zumbido é precursor de ansiedade e depressão ou se ocorre o contrário (ROSA *et al.*, 2012; KARAASLAN *et al.*, 2020), entretanto, é sabido que a incidência de doenças mentais em portadores de zumbido leva a baixa autoestima, o que gera uma maior tendência ao suicídio (ROSA *et al.*, 2012). Geocze *et al.* (2013) avaliaram associação entre os sintomas depressivos e diagnóstico de depressão relacionado ao zumbido. Observou-se que a depressão está relacionada ao zumbido, seja predispondo a uma má adaptação ao zumbido ou como uma consequência da gravidade dele.

Durante a pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, foram avaliados 3103 sujeitos com zumbido pré-existente de 48 países do mundo. Entre os sujeitos que apresentaram sintomas do COVID-19, 40% referiram piora do zumbido. Dos sujeitos que não sofreram com o COVID-19, 32% relataram piora do zumbido e associaram a consequências sociais e emocionais causadas pelo período de pandemia. Aumento da depressão, ansiedade, irritabilidade e preocupações financeiras contribuíram para que o zumbido fosse mais incômodo, além do isolamento social, uso de fones de ouvidos para aulas ou reuniões online e a tensão cervical devido muitas horas usando computador (BEUKES *et al.*, 2020).

Pinto *et al.* (2014) corroboram com a literatura vigente, uma vez que os portadores de zumbido neurosensorial apresentam correlação entre gravidade do zumbido e presença de transtorno psiquiátricos, principalmente ansiedade e depressão. Acrescentaram que a prevalência destes transtornos nos portadores de zumbido foi elevada, com impacto significativo na qualidade de vida dos mesmos. Da mesma forma, Rocha *et al.* (2017) detectaram redução na qualidade de vida de portadores de zumbido com ou sem perda auditiva associada.

3.2 Fisiopatologia do zumbido

A fisiopatologia do zumbido ainda é complexa, porém estudos elucidam que o mesmo se refere a uma ação compensatória da atividade neural do sistema auditivo central (ROBERTS *et al.*; 2010; MAO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016).

A reorganização do sistema auditivo ocorre quando há variação na entrada auditiva, seja por redução da entrada de estímulos por lesões cocleares, ou por aumento, após a uso de aparelhos auditivos ou implantes cocleares (KAPPEL *et al.*, 2011). Assim, alguns pesquisadores sugerem que o mecanismo do zumbido ocorre frente ao desequilíbrio da plasticidade auditivo somatossensorial no núcleo coclear do tronco encefálico (DEHME *et al.*, 2012; KOEHLE *et al.*, 2013), causando degeneração de neurônios do sistema auditivo central em decorrência, possivelmente, da compensação dos danos decorrente da redução da entrada da via auditiva periférica (BROZOSKI *et al.*, 2017). Jastreboff (1990) propôs um modelo neurofisiológico em que o zumbido está relacionado com o sistema límbico, sendo este responsável pela inibição do sintoma que foi gerado pelo sistema auditivo. Quando ocorre um dano no sistema límbico a ineficiência da interação dos sistemas auditivo-límbico impede a inibição do zumbido (JASTREBOFF, HAZELL, 1993; LEAVER *et al.*, 2016).

Em muitos casos o zumbido se desenvolve a partir de lesões cocleares decorrentes da perda da audição de forma súbita, por trauma acústico, pelo envelhecimento do sistema auditivo, bem como pelo uso de medicamentos ototóxicos, os quais afetam a atividade

neuronal normal (LANGGUTH *et al.*, 2013). Observa-se que doses elevadas de salicilato de sódio reduz a eletromotilidade das células ciliadas externas, com prejuízo significativo na inclinação dos cílios das células ciliadas internas, o que provoca menor liberação de neurotransmissores no nervo auditivo (DURANTE, 2013; HOTH, BALJIC, 2017) e ativa neurônios no núcleo coclear e do colículo inferior, gerando excitabilidade neuronal relacionadas ao zumbido (SANTOS *et al.*, 2017).

Pesquisadores que realizaram estudos com salicilato de sódio verificaram alterações em sistema auditivo e no comportamento de roedores. Ralli *et al.* (2010; 2014) avaliaram a ação do salicilato de sódio para indução do zumbido em roedores. O grupo que recebeu salicilato de sódio (300 mg/kg) apresentou redução progressiva da amplitude nas frequências de 8, 12 e 16 KHz, avaliadas no exame emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD), e recuperação após 24h do término do tratamento. As maiores mudanças ocorreram 2 h após a injeção de salicilato em 8 e 12 kHz. Amplitudes retornaram para valores próximos da linha de base no prazo de um dia após o tratamento.

Quanto ao comportamento dos roedores, Jones e May (2017) condicionaram ratos a beberem água durante exposição a um ruído ambiental e observaram que os animais que foram submetidos a administração de salicilato de sódio (250 mg/kg) mantiveram a ação de beber água mesmo sem exposição ao som ambiental, indicando presença de zumbido. Pace *et al.* (2016) também observaram a mudança de comportamento dos roedores que foram submetidos a injeção de 350 mg/kg de SS ao realizarem o mesmo teste.

Neri *et al.* (2006) relataram que a disfunção da microcirculação no ouvido interno pode gerar apoptose dos neurônios auditivos e das células ciliadas. Ao mesmo tempo, podem ocorrer alterações plásticas nos sistemas neurotransmissores no núcleo coclear, dentre os quais destaca-se o óxido nítrico, o qual é produzido pela enzima sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS). O aumento da expressão nNOS em neurônios do núcleo coclear é um importante neuromodulador do zumbido (ZHENG *et al.*, 2006; COOMBER *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2019).

Níveis de estado oxidante total, índice de estresse oxidativo e atividade da enzima prolidase sérica foram maiores em pacientes com zumbido quando comparado ao grupo controle em estudo realizado por Ekince e Kamasak (2020), o que sugere relação com a etiopatogenia do zumbido, já que o estresse oxidativo pode levar a degeneração coclear (CIORBA *et al.*, 2013).

O aumento das espécies reativas de oxigênio está associado a inibição das proteínas, Cx26 (MARTINEZ *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2015) e KCNQ1 (XIONG *et al.*, 2015), como também, a inibição da expressão do transportador de glutamato VGLUT3, que foi encontrada nas células ciliadas internas de roedores expostos a salicilato de sódio, pode contribuir para o desenvolvimento do zumbido (ZHANG *et al.*, 2020). Le Prell *et al.* (2011) acrescentaram que

o aumento do glutamato, neurotransmissor excitatório, pode levar a inflamação das células ciliadas do órgão de Corti e gerar zumbido. Além disso, o aumento da girificação do córtex pré-frontal dorsomedial, observados em sujeitos com zumbido constante, pode ser uma das causas desse sintoma (LEAVER *et al.*, 2012).

3.3 Tratamento para o zumbido

A busca pelo tratamento do zumbido inicia-se pela identificação da causa desse sintoma. Quando identificada é possível estabelecer o tratamento mais adequado. Para o zumbido somatossensorial busca-se tratar a causa, ou seja, as alterações musculares de coluna cervical (BOUSEMA *et al.*, 2018), desvio de articulação temporomandibular (BERNHARDT *et al.*, 2011; BOUSEMA *et al.*, 2018), neoplasias, doenças vasculares (AHSAN, *et al.*, 2015). Sendo assim, a fisioterapia e a acupuntura são procedimentos que podem minimizar as alterações musculares e trazer redução do incômodo com o zumbido (VINAGRE; GUARIENTO, 2018; CÔTÉ *et al.*, 2019).

Para o zumbido auditivo causado por doenças de orelha externa e orelha média, o objetivo deve ser o tratamento das alterações, como otite média (KIM *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2018). Portadores de otite média crônica tiveram zumbido reduzido após timpanoplastia. A avaliação foi realizada através do questionário *Tinnitus Handicap Inventory* e da Escala Analógica Visual (KIM *et al.*, 2018).

Nos casos de zumbido auditivo neurossensorial, causados por lesão na cóclea ou nas vias auditivas centrais, são realizados tratamentos com terapia acústica, a qual inclui sons mascarantes e aparelhos de amplificação sonora individual. Portadores de zumbido crônico decorrente de trauma acústico foram acompanhados por dois anos e avaliados quanto aos efeitos de ambas as terapias acústicas. Os pesquisadores observaram que a amplificação sonora é mais eficaz quando comparado ao gerador de som, possivelmente devido a recuperação da função auditiva e da neuroplasticidade gerada pela amplificação auditiva (JALILVAND *et al.*, 2015).

O uso de agentes farmacológicos é outra forma de tratamento do zumbido neurossensorial (ZENNER *et al.*, 2017). Por considerar que haja semelhança do zumbido com distúrbios do sistema nervoso central, como depressão, ansiedade e insônia, são administrados fármacos anticonvulsivantes, antidepressivos, ansiolíticos, antagonistas dos receptores de glutamato, antiarrítmicos ou relaxantes musculares para portadores de zumbido (LANGGUTH; ELGOYTHN, 2012). Muitas vezes o zumbido é reduzido com o controle medicamentoso da ansiedade e da depressão (ZIAI *et al.*, 2017).

Nos casos de zumbido auditivo neurossensorial, com lesões no sistema auditivo periférico ou central causadas por exposição a ruído, presbiacusia, uso de fármacos para comorbidades como hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e depressão (ONISHI, 2004; FIGUEIREDO; AZEVEDO, 2013b), o uso de produtos naturais pode ser benéfico. Apesar de ser um sintoma comum, a maioria das opções de tratamento objetiva melhorar o impacto ao invés de oferecer a cura, a qual é difícil de ser alcançada (MCFERRAN *et al.*, 2019).

Produtos naturais com efeito relaxante, analgésico, outros com efeito sedativo para tratamento do sistema nervoso ou com potencial para melhorar funções cognitivas vêm sendo exploradas a fim de definir características botânicas e o benefício para a saúde (AVATO; ARGENTIERI, 2018).

O extrato de *Ginkgo biloba* com suas ações antioxidante, vasodilatadora (UDE *et al.*, 2013) e antiapoptótica (YANG *et al.*, 2011) é o produto natural utilizado pelas indústrias farmacêuticas e é o mais requisitado pela equipe médica para o tratamento do zumbido (MAHMOUDIAN-SANI *et al.*, 2017b; ZENNER *et al.*, 2017; PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2018). Flavonoides e terpenos são os principais constituintes ativos do extrato do *Ginkgo biloba* 761 (EGb 761) (KRATZ *et al.*, 2008; CAIEIRO, MARCUCCI, 2010), sendo que o elevado teor de flavonoides, possivelmente, é o responsável pela ação antioxidante deste extrato (CAIEIRO, MARCUCCI, 2010), o que faz neutralizar os radicais livres e evitando o estresse oxidativo nas células auditivas.

Estudos com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) evidenciaram melhora significativa do zumbido, uma vez que portadores relataram a redução do sintoma, por questionários (Mini-Tinnitus Questionnaire - Mini-TQ; Tinnitus Handicap Inventory - THI) e por escala analógica visual ou numérica (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2018; RADUNZ *et al.*, 2020). Roedores também foram testados quanto ao efeito do EGb 761 e obtiveram redução do zumbido, avaliado por teste eletrofisiológico de potencial evocado do tronco encefálico e por inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto (TZIRIDIS *et al.*, 2014; KRAUSS *et al.*, 2016).

Outros produtos naturais também têm sido testados na busca da melhoria do zumbido. Kim *et al.* (2015) avaliaram o efeito do *ginseng* vermelho coreano em sujeitos adultos com zumbido crônico e verificaram que houve melhora do *handicap* do zumbido e do nível de qualidade de vida após o uso do produto natural por quatro semanas. Entretanto, um composto da medicina tradicional chinesa (Er Ming Fang - EMF01) foi testado em roedores com zumbido induzido por salicilato de sódio e não foi verificado efeito significativo com o tratamento (ZHENG *et al.*, 2010).

Savastano *et al.* (2007) verificaram redução do zumbido em sujeitos tratados com um composto de fosfolipídios e vitaminas (glicerofosforilcolina, glicerofosforiletanolamina, b-caroteno, vitamina C, vitamina E). Houve redução do nível de espécies reativas de oxigênio após o tratamento antioxidante de pacientes com zumbido idiopático, além da redução da

percepção do sintoma. Petridou *et al.* (2019) testaram em grupo de portadores de zumbido uma suplementação de antioxidantes e verificaram que o desconforto e a intensidade do zumbido foram reduzidos quando comparados com o grupo controle. Foi verificado melhoria na mudança da expressão das proteínas Cx26 e KCNQ1, presentes na estria vascular, avaliadas em porcos expostos a ruído quando tratados por *radix astragali*, um antioxidante natural (XIONG *et al.*, 2015).

Apesar da vasta literatura acerca da temática envolvida com tratamento para o zumbido, esta continua sendo um desafio (MAKAR *et al.*, 2017). Como antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir o estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, o que gera danos as células (BARBOSA *et al.*, 2010), é sabido que a combinação de antioxidantes dietéticos previne ou retarda lesões oxidativas que geram perda auditiva (HEMAN-ACKAH *et al.*, 2010) e tem mostrado efeito positivo para o tratamento do zumbido. Em adição, os produtos naturais compartilham as propriedades de diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (XIONG *et al.*, 2012a, b).

3.4 Própolis vermelha

A própolis, composto envolvido no presente estudo, é uma mistura complexa, resinosa produzida por abelhas a partir de partes de plantas como brotos, ramos, florais e exsudatos (SILVA, 2006; MONZOTE *et al.*, 2012). É usada por abelhas como material de isolamento, esterilização, impermeabilização, vedação e tratamento antiséptico para evitar a contaminação por animais invasores (MARCUCCI, 1996; MARCUCCI, 2001; LONGHINI, 2007).

No Brasil são descritas diferentes propriedades biológicas e químicas que variam de acordo com a sazonalidade regional e são agrupadas em 13 tipos (BANKOVA *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2000; TRUSHEVA *et al.*, 2006). Sua coloração pode variar do marrom escuro, esverdeado a avermelhado (LOTFY, 2006; INOUE *et al.*, 2007).

A própolis é conhecida pela variedade de atividades farmacológicas, como a ação anti-inflamatória, antioxidante (DE MENDONÇA *et al.*, 2015), antiproliferativa, antidiabética, anticancerígena (PINHEIRO *et al.*, 2014), antimicrobiana (GRENHO *et al.*, 2015), antiviral, antifúngica e antibacteriana (RISTIVOJEVIĆ *et al.*, 2015). A diversidade de propriedades biológicas da própolis vermelha se dá em função dos flavonoides e dos ácidos fenólicos (DAUGSCH *et al.*, 2008; DE MENDONÇA *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2017).

A própolis vermelha é encontrada no Brasil (DAUGSCH *et al.*, 2008), bem como em Cuba, China, México e Venezuela (REGUEIRA NETO *et al.*, 2017), e é associada a diferentes origens botânicas. Em Cuba *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) é a fonte vegetal da própolis

vermelha e, na Venezuela, *Clusia scrobiculata* (TRUSHEVA *et al.*, 2006; PICCINELLI *et al.*, 2011). No México, a própolis tem a mesma origem botânica brasileira, exsudato do caule da *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub, Fabaceae, coletada por abelhas *Apis mellifera* (Apidae). No Brasil, a própolis vermelha, coletada da planta conhecida como rabo-de-bugio, é encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Roraima e Sergipe (LOTTI *et al.*, 2010; LOPEZ *et al.*, 2014; RUFATTO *et al.*, 2017).

Frozza *et al.* (2013) relataram que o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV) proveniente de Sergipe apresenta grande concentração de formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, madicarpina e biochanina A em sua composição química. Tem como marcador químico a formononetina (RIBEIRO *et al.*, 2015), uma isoflavona que atua em diferentes processos fisiológicos. Os compostos químicos majoritários encontrados na própolis vermelha do estado de Alagoas foram daidizeína, formononetina e biochanina A (MENDONÇA *et al.*, 2020a).

De acordo com Da Silva *et al.* (2015), ao investigar toxicidade do EHPV, a dose letal mediana (DL 50) na avaliação da toxicidade aguda foi encontrada acima de 300 mg/kg, e a toxicidade subaguda foi encontrada nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, demonstrada por meio de sinais clínicos, alterações hematológicas e pela massa dos órgãos, podendo causar leve toxicidade.

Frozza *et al.* (2013) detectaram atividade antioxidante no extrato hidroetanólico da própolis vermelha sergipana, com IC₅₀ de 270,13 µg/mL, que confirma potencial de eliminação de DPPH. Andrade *et al.* (2017) avaliaram os extratos hidroalcoólicos das própolis marrom, verde e vermelha do nordeste brasileiro e, também, relataram grande potencial antioxidante, especialmente da própolis vermelha, determinado pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Dantas Silva *et al.* (2017) avaliaram vários tipos de própolis de diferentes regiões do Brasil e verificaram, pelo método ABTS, que a própolis vermelha apresenta maior propriedade antioxidante quando comparada com as própolis marrom e verde. Estudo desenvolvido por Mendonça *et al.* (2020b) atribuiu à atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha coletada no município de Brejo Grande/Sergipe/Brasil (IC₅₀ de 294 µg/mL) o efeito gastroprotetor por inibir o desenvolvimento de úlceras gástricas em roedores. Estudos atribuem a ação protetora da própolis vermelha contra o estresse oxidativo aos ácidos fenólicos e flavonoides, uma vez que são capazes de eliminar os radicais livres (RIGHI *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2017).

A ação anti-inflamatória também foi encontrada no extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sergipana, assim como na isoflavona formononetina, de acordo com estudo de Lima-Cavendish *et al.* (2015). Os pesquisadores relataram inibição da dor inflamatória induzida por glutamato com a administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha nas dosagens de 10 e 30 mg/kg em roedores. Bueno-Silva *et al.* (2017) demonstraram o

potencial anti-inflamatório da própolis vermelha sergipana através da modulação das vias NF-KB e MAPK, que inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuem a expressão de genes de famílias de citocinas pró-inflamatórias. Batista *et al.* (2018) avaliaram roedores expostos a radiação UVB e atribuíram a ação fotoprotetora da própolis vermelha do estado de Alagoas as suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante. A ação anti-inflamatória da própolis vermelha também foi detectada no estudo de Barbosa Bezerra *et al.* (2017) ao avaliarem tratamento de roedores com colite ulcerativa induzida. O EHPV 10 mg/kg reduziu significativamente a expressão de iNOS quando comparado ao grupo com colite ulcerativa induzida não tratado com EHPV 10 mg/kg.

Liang *et al.* (2014) avaliaram roedores com lesão cerebral e observaram inibição de processos apoptóticos e melhoria de déficit neurológico com o uso da formononetina, marcador químico da própolis vermelha, atribuindo as suas ações antiapoptótica e neuroprotetora. Barbosa *et al.* (2016), em estudo de lesão do nervo ciático de roedores, elucidaram ação neuroprotetora da própolis vermelha coletada no município Brejo Grande/SE, uma vez que promoveu regeneração e recuperação funcional acelerada após compressão do nervo ciático. Ação neuroprotetora da própolis vermelha coletada no mesmo município também foi evidenciada no tratamento de roedores com lesão medular quando se observou diminuição de morte neuronal (DOS SANTOS, 2018). Da mesma forma, foi observado efeito antidiscinético em roedores tratados com EHPV verificado em testes de comportamento e avaliação imunohistoquímica neuronal (BARROSO, 2019).

3.5 Testes auditivos

3.5.1 Timpanometria

A timpanometria é um dos métodos objetivos utilizados no diagnóstico audiológico funcional de orelha média imprescindível para verificar a integridade da membrana timpânica e do sistema tímpano ossicular para a condução do som até a orelha interna (HOTH, BALJIC, 2017).

O equipamento envia uma pressão de ar em uma orelha por vez com o objetivo de avaliar o sistema tímpano ossicular e a mobilidade da membrana timpânica (JERGER, 1970; GEAL-DOR *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2007). Um gerador de estímulo sonoro transmite a energia acústica do canal auditivo externo para a orelha média, enquanto o equipamento exerce uma pressão positiva, +200 DecaPascal (daPa), que é reduzido progressivamente até atingir a pressão máxima negativa, -400 daPa. A captação é realizada pelo microfone, que gera uma curva timpanométrica como resposta.

As curvas timpanométricas são consideradas normais nos seres humanos quando a compliância está acima de 0,30 (curva tipo A) (ONUSKO, 2004). Não há relatos de valores de normalidade para ratos, porém estudos experimentais com roedores utilizaram a classificação de Onusko (2004), que relata curva timpanométrica com altura normal, elevada e reduzida. O mesmo autor acrescenta que a curva normal apresenta pico de pressão de ar próximo a zero.

3.5.2 Emissões otoacústicas por produto de distorção

O teste emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) permite a avaliação do sistema auditivo periférico e central. As emissões são sons gerados pela cóclea normal e transmitidos através dos ossículos e da membrana timpânica, medidas no conduto auditivo externo, na presença de um estímulo acústico (AZEVEDO, 2003).

As EOAPD têm características pré-neurais, não-audíveis e são evocadas por dois sinais sonoros simultâneos de fraca intensidade (f_1 e f_2), que resultam na formação de uma terceira frequência devido a inabilidade da cóclea em responder aos dois sinais simultâneos. A análise das EOAPD é realizada seguindo a relação de frequência de $2F_1 - F_2$ com relação $F_1:F_2 = 1,22$ com resolução de dois pontos por oitava, realizado nas frequências de 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 kHz. As frequências F_1 com intensidade de 65 dB SPL e F_2 de 55 dB SPL foram mensuradas a uma taxa de aceitação de ruído de no máximo 10 dB. As EOAPD são normalmente traçadas em função das frequências tonais primárias, já que dados demonstram que $2F_1-F_2$ é gerada na região da cóclea que responde a tons primários. A análise das EOAPD é realizada pelo gráfico DPgram que apresenta as amplitudes das respostas (HENLEY *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2008).

3.6 Testes comportamentais

3.6.1 Campo aberto

O teste comportamental campo aberto é utilizado para avaliação da atividade motora e do estado emocional (ansiedade) do animal (SCHMITT; HIEMKE, 1998). Consiste na mensuração de comportamentos expressados ao se colocar um animal em espaço aberto novo, de onde a fuga do mesmo é evitada pelas paredes que o circundam (WHIMBEY; DENENBERG, 1967; WALSH; CUMMINS, 1976).

O animal é colocado no centro de uma arena com dezesseis quadrantes e liberado com as patas dianteiras no chão. É avaliada a frequência de comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos pelo animal com as três patas - *crossings*), exploração vertical (manutenção do animal apenas sobre as patas posteriores - *rearing*), entrada na área central, número de bolos fecais expelidos e comportamentos de autolimpeza (*grooming*) executados (ROYCE, 1977; DANTAS *et al.*, 2014). De acordo com Hall (1934), a alta defecação indica ansiedade no animal.

3.6.2 Labirinto em cruz elevado

O teste comportamental labirinto em cruz elevado avalia o estado emocional, verificando a ansiedade de animais de laboratório (PELLOW *et al.*, 1985). Neste teste ocorre o conflito de aproximação e esquiva do animal, somado a tendência natural de esquivas a locais abertos, potencialmente perigosos e conflituosos. É o principal teste comportamental utilizado para avaliar ansiedade em roedores e os efeitos farmacológicos de novas drogas (PINTO *et al.*, 2012). Estudos realizados com animais com zumbido induzido utilizaram o teste labirinto em cruz elevado (PACE; ZHANG, 2013; LAUER *et al.*, 2018).

O animal é colocado no centro de um labirinto constituído por dois braços abertos opostos um ao outro e dois braços fechados com teto aberto também opostos, que cruzam perpendicularmente aos abertos. São avaliados o número de entrada com as quatro patas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. É indicativo de ansiedade a redução da entrada e do tempo gasto em braço aberto (PELLOW *et al.*, 1985; PINTO *et al.*, 2012).

3.6.3 Nado forçado

Para avaliar comportamento de animais semelhante ao de portadores da patologia depressão é utilizado o teste nado forçado. Consiste em duas sessões separadas por um período de 24 horas em que o animal é colocado para nadar em espaço restrito, de onde ele não pode escapar. Inicialmente há predomínio de comportamentos ativos, em que o animal tenta escapar da situação supostamente aversiva. Posteriormente, há um comportamento passivo de imobilidade interpretada como falha na persistência do comportamento de fuga (PORSOLT *et al.*, 1978). Esta característica de imobilidade no nado forçado reflete no animal um estado de desespero semelhante a depressão (PORSOLT *et al.*, 1978; MICHELAN *et al.*, 2006; DANTAS *et al.*, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de caráter experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Tiradentes, seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), protocolo número 030917 (Anexo 1). A experimentação animal foi desenvolvida no período de julho/2018 a junho/2019.

4.1 Ensaio biológico

4.1.1 Materiais

O salicilato de sódio foi fabricado em 03/2016, lote 80013, com validade até 03/2020 e obtido da empresa Dinâmica Química Contemporânea LTDA. Foi dissolvido em solução salina e usado para induzir o zumbido nos roedores.

A própolis vermelha foi obtida dos apiários do Povoado Brejão dos Negros, município de Brejo Grande, Sergipe, Brasil, em novembro de 2014, nas coordenadas geográficas de S10°26'25"; O 36°26'12". O rendimento amostra de própolis vermelha (200 g) foi de 17,46% m/v e identificados nos espectros de massa os seguintes componentes químicos: liquiritigenina, formononetina, biochanina A, medicarpina e retusapurporina, conforme descrito por Dos Santos (2018). A autora acrescenta os resultados da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) dos marcadores químicos daidizeína ($4,16 \pm 0,22 \mu\text{g/mg}$), formononetina ($9,21 \pm 0,10 \mu\text{g/mg}$) e biochanina A ($7,08 \pm 0,09 \mu\text{g/mg}$). O extrato hidroetanólico de própolis vermelha foi dissolvida em Tween 80 a 2% e água destilada e utilizada para investigar efeito protetor na cóclea e no núcleo coclear.

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi fabricado pela empresa Neon e comercializado pela Dinâmica Química Contemporânea LTDA. Fabricado em 10/08/2018, lote 45994, válido até 09/08/2023. O EDTA foi dissolvido em água destilada na proporção 1 g / 100 mL e utilizado para descalcificação dos aparelhos auditivos.

4.1.2 Animais

Um total de 21 ratos Wistar machos com idade de três a quatro meses (250 – 350 g) provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, Aracaju/SE, foram utilizados no experimento. Os roedores foram alojados em trio em gaiolas com cama de maravalha, em

temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h e livre acesso a água e ração para roedores.

4.2 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em três grupos e submetidos as avaliações auditiva e comportamental, conforme fluxograma apresentado na Figura 1.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: controle -CTR (n=9), salicilato de sódio/veículo - SS/VC (n=6) e salicilato de sódio/extrato hidroetanólico de própolis vermelha - SS/EHPV (n=6). Foram submetidos a testes auditivos (timpanometria e emissões otoacústicas por produto de distorção) e comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado). Durante quatro dias receberam EHPV (30 mg/kg; grupo SS/EHPV) ou veículo (*tween* 80 a 2% em água destilada; grupo SS/VC) por via oral (0,5 mL) (LIMA-CAVENDISH *et al.*, 2015) e após uma hora foi administrado salicilato de sódio (350 mg/kg; grupos SS/EHPV e SS/VC) (RÜTTIGER *et al.*, 2003; RADZIWON *et al.*, 2015; PACE *et al.*, 2016; JONES; MAY, 2017) por via intraperitoneal - i.p. (0,5 mL). O grupo CTR foi pré-tratado com água destilada (0,5 mL, via oral) e recebeu solução salina (0,5 mL, i.p.). O teste comportamental campo aberto e o pré-teste do nado forçado foram realizados duas horas após a administração do salicilato de sódio ou solução salina no terceiro dia. No quarto dia, 2h após a administração do salicilato de sódio ou solução salina, os roedores foram submetidos aos testes comportamentais labirinto em cruz elevado e nado forçado (LAUER *et al.*, 2018), como também a inspeção do meato acústico externo, timpanometria e emissões otoacústicas por produto de distorção e, em seguida, foram eutanasiados.

4.3 Testes auditivos

Para a avaliação da função auditiva, os roedores foram anestesiados por via intraperitoneal através da combinação de cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (14 mg/kg, i.p.), 1 mL/100 g (KRAUSS *et al.*, 2016; SOYALIÇ *et al.*, 2016; JONES, MAY, 2017) e alocados em sala silenciosa com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a fim de realizar os testes auditivos.

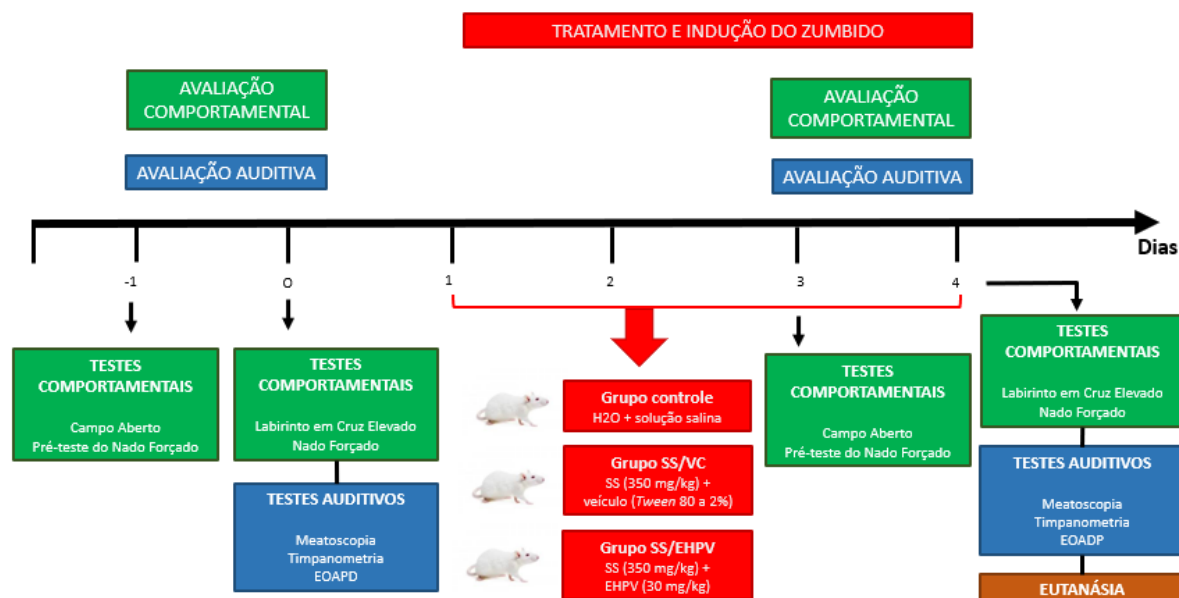


Figura 1 – Fluxograma da abordagem experimental (Grupo CTR - grupo não lesionado, tratado com água destilada; Grupo SS/VC - grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada; Grupo SS/EHPV - grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg).

4.3.1 Inspeção do meato acústico externo

A inspeção do meato acústico externo foi realizada com o uso de otoscópio (Welch Allyn, Pocket Junior, 22840, SP, Brasil) com espéculos esterilizados. Os animais que não apresentaram obstrução de meato acústico externo foram submetidos ao exame de medidas de imitância acústica com a pesquisa da curva timpanométrica (FROTA, 2003); os que apresentaram obstrução de meato acústico externo foram excluídos do estudo.

4.3.2 Timpanometria

A timpanometria foi realizada com a introdução de uma sonda com tom de 226 Hz na orelha do animal (Figura 2) com oliva para recém-nascido com o uso do equipamento imitanciômetro (Interacoustics, AT 235, Dinamarca, USA), calibrado de acordo com a resolução nº 365 de 30 de março de 2009 do Conselho Federal de Fonoaudiologia. O equipamento enviou uma pressão de ar em uma orelha por vez. O gerador de estímulo sonoro transmitiu a energia acústica do canal auditivo externo para a orelha média, enquanto o equipamento exerceu uma pressão positiva, +200 DecaPascal (daPa), que foi reduzido progressivamente até atingir a pressão máxima negativa, -400 daPa (JERGER, 1970; GEAL-

DOR *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2007). A captação foi realizada pelo microfone, que gerou uma curva timpanométrica como resposta e foi utilizada a classificação de Onusko (2004) para interpretação dos resultados: curva timpanométrica normal quando apresentou pico de pressão de ar próximo a zero, e curvas elevadas ou reduzidas foram classificadas como alteradas.

Os animais que apresentaram curvas timpanométricas normais foram incluídos no estudo.



Figura 2 – Teste auditivo timpanometria.

4.3.3 Emissões otoacústicas por produto de distorção

O teste emissões otoacústicas por produto de distorção foi realizado com o uso do equipamento Otodynamics, OTOPORT TE+DP, Reino Unido, Inglaterra, devidamente calibrado (Figura 3) e investigadas as frequências de 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 kHz. Foi introduzida uma sonda em cada orelha do animal por vez que emitiu dois sinais sonoros simultâneos de fraca intensidade (f_1 e f_2). A frequência F_1 teve as intensidades de 65 dB SPL e F_2 de 55 dB SPL mensuradas a uma taxa de aceitação de ruído de no máximo 10 dB e resultaram na formação de uma terceira frequência. A análise das EOAPD foi realizada seguindo a relação de frequência de $2F_1 - F_2$ com relação $F_1:F_2 = 1,22$ com resolução de dois pontos por oitava. As EOAPD são normalmente traçadas em função das frequências tonais primárias, já que dados demonstram que $2F_1 - F_2$ é gerada na região da cóclea que responde a tons primários. A análise das EOAPD foi realizada pelo gráfico DPgram que apresentou as amplitudes das respostas e foram consideradas como presentes quando a amplitude foi ≥ 3 dB em relação ao nível de ruído (HENLEY *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2008; RALLI *et al.*, 2014; SOYALIÇ *et al.*, 2016; SALIHOGLU *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2019; PARHAM *et al.*, 2019).



Figura 3 - Teste auditivo emissões otoacústicas por produto de distorção.

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Campo aberto

O equipamento utilizado para o teste comportamental campo aberto, arena, foi confeccionado em madeira, recoberto de fórmica na cor branca. Consiste em um quadrilátero com 4830,25 cm² de área e paredes com 34,5 cm de altura, cuja base é subdividida em dezesseis quadrantes. O animal foi colocado no centro da arena e liberado com as patas dianteiras no chão. Entre o teste de um animal e outro, a arena foi limpa com álcool para evitar a influência do cheiro de outros animais (Figura 4).

O comportamento do animal foi registrado em vídeo e avaliado por cinco minutos os seguintes parâmetros: frequência dos comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos pelo animal com as três patas), exploração vertical (manutenção do animal apenas sobre as patas posteriores), entrada na área central, número de bolos fecais expelidos e comportamentos de autolimpeza executados (ROYCE, 1977; DANTAS *et al.*, 2014).

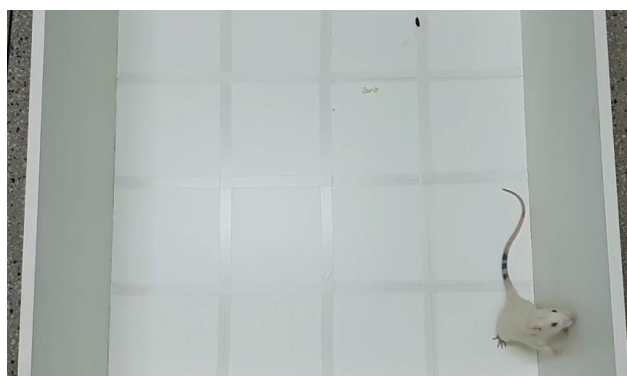


Figura 4 - Teste comportamental campo aberto.

4.4.2 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado foi constituído por dois braços abertos opostos um ao outro e dois braços fechados com teto aberto também opostos, que cruzam perpendicularmente aos abertos (PELLOW *et al.*, 1985). Foi confeccionado em madeira, elevado 40 cm do chão. Braços abertos sem bordas e braços fechados com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura. Os braços fechados possuem bordas com 40 cm de altura.

O animal foi colocado no centro do labirinto e liberado com as patas dianteiras no chão. Entre o teste de um animal e outro, o labirinto foi limpo com álcool para evitar a influência do cheiro de outros animais (Figura 5). O comportamento do animal foi registrado em vídeo por cinco minutos. Os parâmetros comportamentais avaliados foram entrada com as quatro patas em braço aberto e tempo de permanência em braço aberto. Foi considerado indicativo de ansiedade a redução da entrada e do tempo gasto em braço aberto (PELLOW *et al.*, 1985 PINTO *et al.*, 2012).



Figura 5 - Teste comportamental labirinto em cruz elevado.

4.4.3 Nado Forçado

O teste nado forçado ocorreu em duas sessões separadas por 24 horas. A primeira sessão, chamada de pré-teste, teve duração de 15 minutos e a segunda sessão realizada no dia seguinte, chamada de teste, duração de cinco minutos. Foi realizado em um tanque de 60 cm de largura e 80 cm de comprimento cheio de água limpa com profundidade de 30 cm (Figura 6).

O animal foi colocado para nadar no espaço restrito, de onde ele não pode escapar. Cessando as tentativas de escapar se torna imóvel, um pouco encurvado, em posição vertical,

com apoio na ponta de uma das patas posteriores no fundo ou na parede, ou em flutuação, mantendo apenas pequenos movimentos para deixar a cabeça acima da água. A procura de novas posturas com movimentos rápidos não foi considerada finalização. O tempo de imobilidade e de natação foi registrado em cronômetro. A imobilidade do animal reflete um estado de desespero equivalente a depressão (PORSOLT *et al.*, 1978; MICHELAN *et al.*, 2006; DANTAS *et al.*, 2014).

Ao final das sessões, os animais foram retirados do tanque, enxutos com uma toalha e colocados para aquecer sob uma lâmpada por 15 minutos.



Figura 6 - Teste comportamental nado forçado.

4.5 Dissecação e fixação da cóclea e do tronco encefálico

Após os ratos serem eutanasiados em câmara de gás (CO₂) foi realizado procedimento de dissecação nos animais com o objetivo de remover os aparelhos auditivos e tronco encefálico. O acesso ocorreu por meio da separação da cabeça. A pele foi puxada em direção a cabeça, que foi esvaziada pela base. Os aparelhos auditivos foram removidos a partir do osso temporal e fixados em formalina por sete dias. Posteriormente, foram descalcificados por imersão em 10% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por 15 dias, sendo trocado a cada dois dias e reidratadas por 24 horas em água corrente. Cada aparelho auditivo foi submetido à análise macroscópica e realizado corte transversal no tecido coclear do ouvido interno (MÜLAZIMOĞLU *et al.*, 2017; SAKAMOTO *et al.*, 2017).

O tronco encefálico também foi fixado em formalina por sete dias e submetido a macroscopia para análise do núcleo coclear.

O tecido coclear e o tronco encefálico foram desidratados em sete séries graduadas de etanol, diafanizados em duas séries de xilol e infiltrados em duas séries de parafina.

A inclusão em parafina foi realizada sob a forma de blocos para obter cortes de 5 µm em micrótomo. Após o corte transversal, foram preparadas três lâminas com três secções cada uma. Foram colocadas em banho maria aquecido de 40 °C - 45 °C e levadas a estufa a

60°C para retirar o excesso de parafina e melhorar a adesão do corte a lâmina (SCHMITZ *et al.*, 2014; MÜLAZIMOĞLU *et al.*, 2017; SAKAMOTO *et al.*, 2017).

As secções do tronco encefálico foram obtidas em micrótomo tomando-se como base as coordenadas do Atlas The Rat Brain de Paxinos e Watson (1998) para localização do núcleo coclear (SEKIYA *et al.*, 2011; FREDRICH *et al.*, 2013).

4.6 Análise Histológica

A técnica da coloração hematoxilina eosina consiste em manter as secções de tecido em contato em três séries de xilol, cinco séries de álcool (100%, 100%, 95%, 80%, 70%), duas séries de água, corar com hematoxilina de Harris por 120 segundos, lavar em duas séries de água, corar com a solução de eosina por 30 segundos. A seguir as lâminas foram submetidas a uma bateria de álcool em concentração crescente (80%, 95%, 100%, 100%) e três séries de xilol. Foi colocado bálsamo do Canadá na lâmina para fixação da lamínula. Foram avaliadas três secções de lâminas obtidas de cada animal (BARBOSA *et al.*, 2016; BARBOSA BEZERRA *et al.*, 2017).

Foram avaliados os aspectos estruturais das rampas vestibular e timpânica, ducto coclear, órgão de Corti, membrana basilar, membrana tectorial, membrana de Reissner, estria vascular e gânglio espiral do tecido coclear em três secções, aumento 40x e 800x. Foi analisada a morfologia de neurônios no núcleo coclear em três secções, aumento 40x e 100x.

4.7 Análise de imagens

A análise das imagens foi realizada utilizando microscópio binocular (Olympus CX31, São Paulo/SP, Brasil) no aumento de 40x, 100x e 800x acoplado a câmera fotográfica Olympus. A imagem foi transferida para o computador para realização de análise morfológica. As identificações das lâminas foram ocultadas ao examinador para realização de análise cega quanto ao grupo experimental (BARBOSA *et al.*, 2016).

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no *GraphPad Prism 5.0*. Foi aplicado teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Para análise de médias de amplitudes do teste EOAPD e para o teste comportamental nado forçado foi utilizado ANOVA *Two-Way* com medidas repetidas

e pós-teste de *Bonferroni* para comparações entre os grupos. Uma vez que se observou distribuição não Gaussiana, foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* para análise das médias de compliância e pressão do teste timpanométrico, como também nos testes comportamentais campo aberto e labirinto em cruz elevado. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS

Ao realizar a inspeção do meato acústico externo na orelha externa não foi observado obstrução, como presença de cerume ou sinais de infecção, e perfuração de membrana timpânica em nenhuma das orelhas dos animais e, portanto, todos os animais foram submetidos a avaliação da orelha média.

Por não ser observado diferença entre as orelhas direita e esquerda no teste T pareado, os dados foram agrupados por animal e analisados com o uso do teste estatístico não paramétrico *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn* para análise das médias de compliância e de pressão na timpanometria, e o teste estatístico paramétrico ANOVA *Two-Way* com pós-teste de *Bonferroni* para análise das médias de amplitude nas emissões otoacústicas por produto de distorção ($p > 0,05$).

Foi realizado o teste timpanométrico, avaliadas a compliância e o pico da pressão do ar. A compliância variou entre 0,07 mL e 0,51 mL e o pico da pressão de ar não ultrapassou -100daPa. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos CTR, SS/VC e SS/EHPV ao avaliar a compliância ($p = 0,1504$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) (Figura 7A) e a pressão de ar encontrados nas orelhas dos animais ($p = 0,7239$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) (Figura 7B).

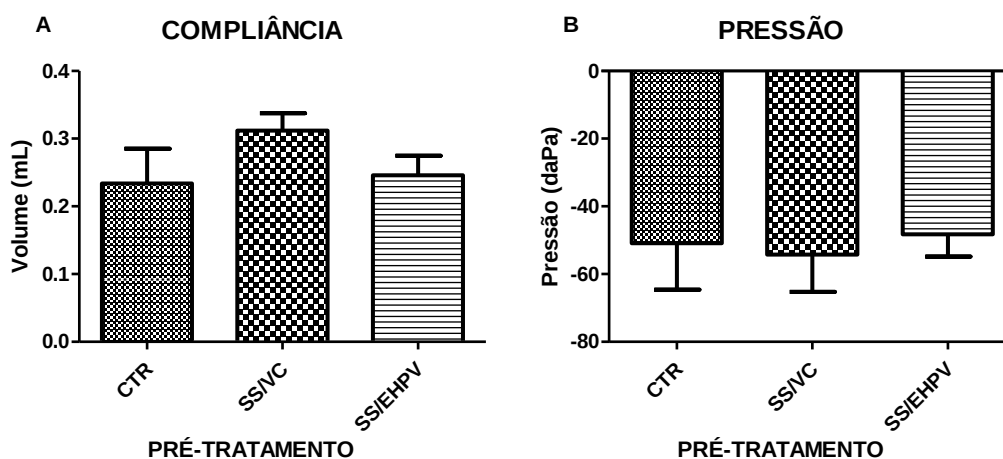


Figura 7 - Compliância e pressão avaliadas no pré-tratamento encontrada no teste timpanométrico entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Teste estatístico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*.

Após a administração das substâncias, mais uma vez foi realizado o teste timpanométrico e avaliados a compliância e o pico da pressão do ar. A compliância variou entre 0,06 mL e 0,36 mL, e não houve diferença estatística significativa entre os grupos CTR,

SS/VC e SS/EHPV ($p = 0,8394$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) (Figura 8A). O pico da pressão de ar não ultrapassou -100daPa e, também, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,7239$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) (Figura 8B).

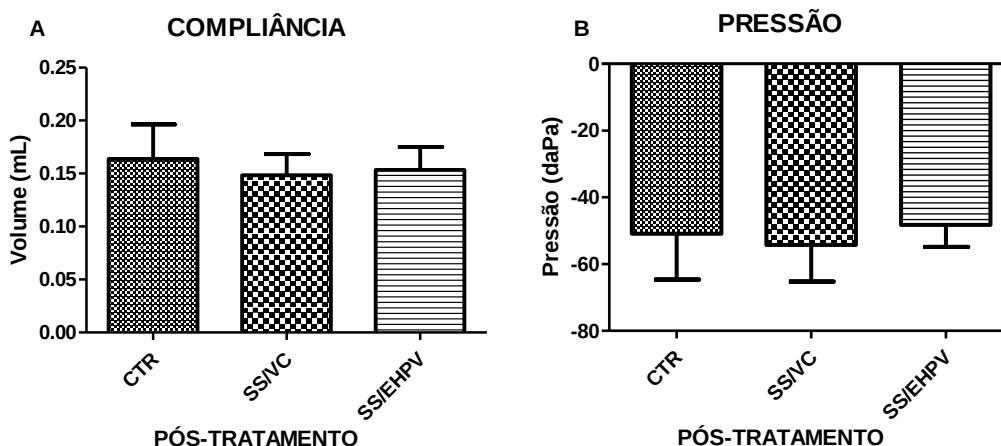


Figura 8 - Compliância e pressão avaliadas no pós-tratamento encontrada no teste timpanométrico entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Teste estatístico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*.

No teste emissões otoacústicas por produto de distorção foram investigadas as frequências de 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 kHz. Por não terem sido encontrados resultados para frequências baixas, foram avaliadas apenas as frequências de 6 e 8 kHz. A avaliação da amplitude na frequência de 6 kHz não evidenciou interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{2-74} = 1,15$; $p = 0,32$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*). Houve efeito significativo entre os tratamentos ($F_{2-74} = 4,85$; $p = 0,010$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*), onde o grupo SS/VC apresentou amplitude menor que o grupo CTR e o grupo SS/EHPV apresentou amplitude maior que o grupo SS/VC, ambos no pós-tratamento. Também houve efeito significativo com relação ao tempo ($F_{1-74} = 7,22$; $p = 0,008$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*), onde grupo SS/VC apresentou amplitude menor no pós-tratamento em relação ao pré-tratamento (Figura 9A).

Ao avaliar a amplitude da frequência de 8 kHz também não foi evidenciada interação significativa entre tratamentos e tempo ($F_{2-70} = 1,14$; $p = 0,32$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*). Houve efeito significativo entre os tratamentos ($F_{2-70} = 6,75$; $p = 0,002$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*), onde a amplitude do grupo SS/VC foi menor que do grupo CTR e o grupo SS/EHPV apresentou amplitude maior que o grupo SS/VC, ambos no pós-tratamento. Houve efeito significativo entre os tempos ($F_{1-70} = 8,55$; $p = 0,004$; ANOVA *Two-*

Way, pós-teste de *Bonferroni*), onde o grupo SS/VC apresentou amplitude menor no pós-tratamento em relação ao pré-tratamento (Figura 9B).

Na avaliação das frequências de 6 kHz e 8 kHz não houve diferença estatística significativa da amplitude entre os grupos CTR e SS/EHPV no pré e no pós-tratamento ($p > 0,05$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*) (Figura 9).

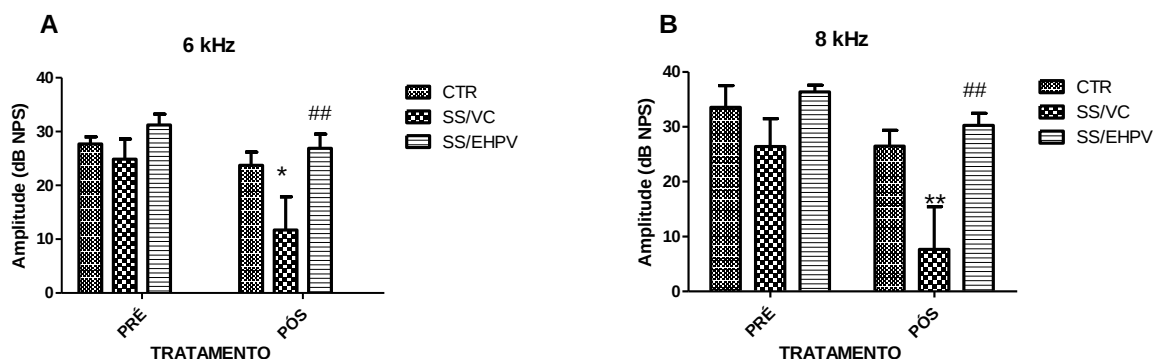


Figura 9 - Amplitude encontrada no teste emissões otoacústicas por produto de distorção nas frequências de 6 e 8 kHz pré e no pós-tratamento. Grupos: CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). As colunas representam as médias e as barras representam o EPM. Símbolos indicam valores significativamente distintos (* - $p < 0,05$ SS/VC diferente de CTR; ** - $p < 0,01$ SS/VC diferente de CTR; ## - $p < 0,01$ SS/EHPV diferente de SS/VC). Teste estatístico ANOVA *Two-Way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*.

A exploração horizontal avaliada no teste comportamental campo aberto revelou diferença estatística significativa ($p = 0,04$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*), onde o grupo SS/VC apresentou menos explorações quando comparado ao grupo controle (Figura 10A). A exploração vertical avaliada no mesmo teste apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,003$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*), onde o grupo SS/VC apresentou menos explorações que o grupo CTR e o grupo SS/EHPV apresentou mais explorações que o grupo SS/VC (Figura 10B).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos quando avaliado a quantidade de bolos fecais ($p = 0,09$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*), a autolimpeza ($p = 0,21$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) e a exploração na área central da arena ($p = 0,68$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) no teste comportamental campo aberto (Tabela 1).

Quando avaliado o teste comportamental labirinto em cruz elevado observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos na média de entrada no braço aberto ($p = 0,13$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) e na média do tempo no braço aberto ($p = 0,17$; *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*) (Tabela 2).

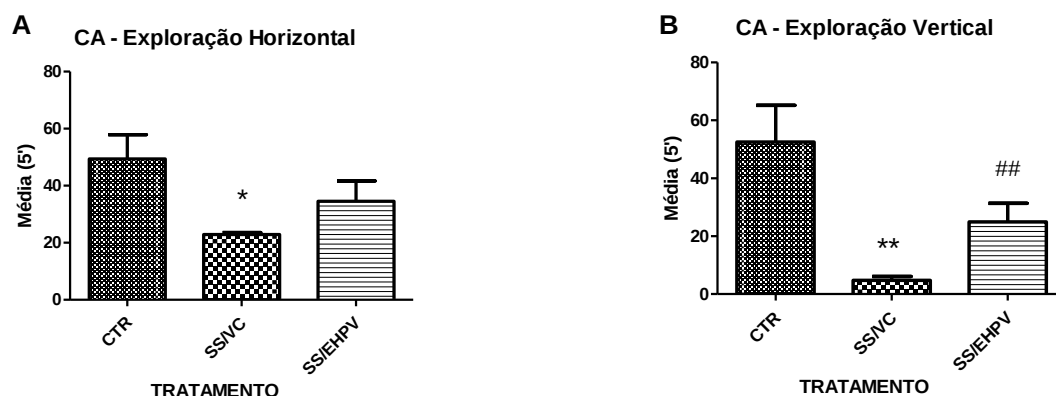


Figura 10 - Médias de explorações horizontal e vertical encontradas no teste comportamental campo aberto entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). As colunas representam as médias e as barras representam o EPM. Símbolos indicam valores significativamente distintos (* - $p < 0,05$ SS/VC diferente de CTR; ** - $p < 0,01$ SS/VC diferente de CTR; ## - $p < 0,01$ SS/EHPV diferente de SS/VC). Teste estatístico *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunn*.

Tabela 1 – Média de comportamentos exibidos no teste campo aberto

Grupos	Bolos fecais Média ($\pm$ EPM)	Autolimpeza Média ($\pm$ EPM)	Área central Média ($\pm$ EPM)
CTR	3,2 ($\pm$ 0,8)	1,0 ($\pm$ 0,5)	0,2 ($\pm$ 0,2)
SS/VC	0,1 ($\pm$ 0,1)	1,1 ($\pm$ 0,5)	0,0 ($\pm$ 0,0)
SS/EHPV	1,5 ($\pm$ 0,5)	2,8 ($\pm$ 1,1)	1,5 ($\pm$ 1,0)

CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados $p > 0,05$ (*Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunn*).

Tabela 2 – Média de comportamentos exibidos no teste labirinto em cruz elevado

Grupos	Entrada no braço aberto Média ($\pm$ EPM)	Tempo no braço aberto Média ($\pm$ EPM)
CTR	0,2 ($\pm$ 0,2)	7,0 ($\pm$ 7,0)
SS/VC	1,6 ($\pm$ 0,4)	38,6 ($\pm$ 12,3)
SS/EHPV	1,5 ($\pm$ 0,8)	25,0 ($\pm$ 13,6)

CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados $p > 0,05$ (*Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunn*).

A avaliação do tempo de imobilidade no teste comportamental nado forçado não evidenciou interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{2-8} = 0,79$; $p = 0,48$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*). Não houve efeito significativo entre os tratamentos ($F_{2-8} = 0,16$; $p = 0,85$), como também entre o tempo ($F_{1-8} = 0,03$; $p = 0,86$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*) (Figura 11A). A avaliação do tempo de nado também não evidenciou interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{2-16} = 1,95$; $p = 0,17$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*). Não houve efeito significativo entre os tratamentos ($F_{2-16} = 0,90$; $p = 0,42$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*), como também entre o tempo ($F_{1-16} = 1,52$; $p = 0,23$; ANOVA *Two-Way*, pós-teste de *Bonferroni*) (Figura 11B).

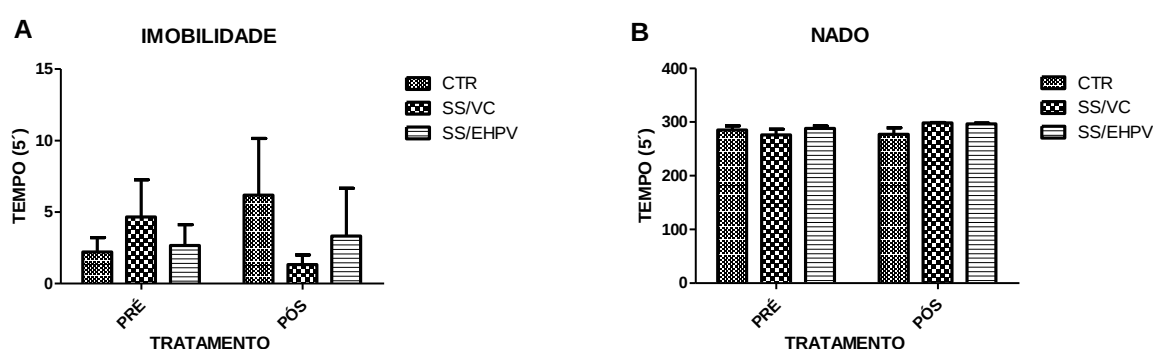


Figura 11 - Média do tempo de imobilidade e de nado no teste comportamental nado forçado no pré e no pós-tratamento entre os grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg). Teste estatístico ANOVA *Two-Way*, seguido de pós-teste de *Bonferroni*.

A análise histomorfológica do tecido coclear do grupo controle mostrou integridade com definição das rampas vestibular e timpânica, órgão de Corti, membrana basilar e estria vascular; o grupo SS/VC apresentou atrofia do tecido coclear (Figura 12).

No grupo CTR (Figura 13A) o órgão de Corti exibe características histológicas compatíveis com a normalidade, expressas pela presença de células volumosas de diâmetro variável, com citoplasma amplo, opticamente claro e finamente granular e núcleos redondos, apresentando estereocílios em sua porção apical (células ciliadas). Estas células apresentavam dois padrões morfológicos distintos: *i*) células mais globosas, com 10 a 12 μm dispostas em fileira única (células ciliadas internas), e *ii*) células cilíndricas ou cúbicas altas, com 9 a 10 μm de diâmetro, formando 2 a 3 camadas celulares (células ciliadas externas) que se apoiavam em uma estrutura eosinofílica homogênea interpretada como membrana basilar. Adjacente às células ciliadas, e a estas conectadas por estereocílios, era observada a membrana tectorial.

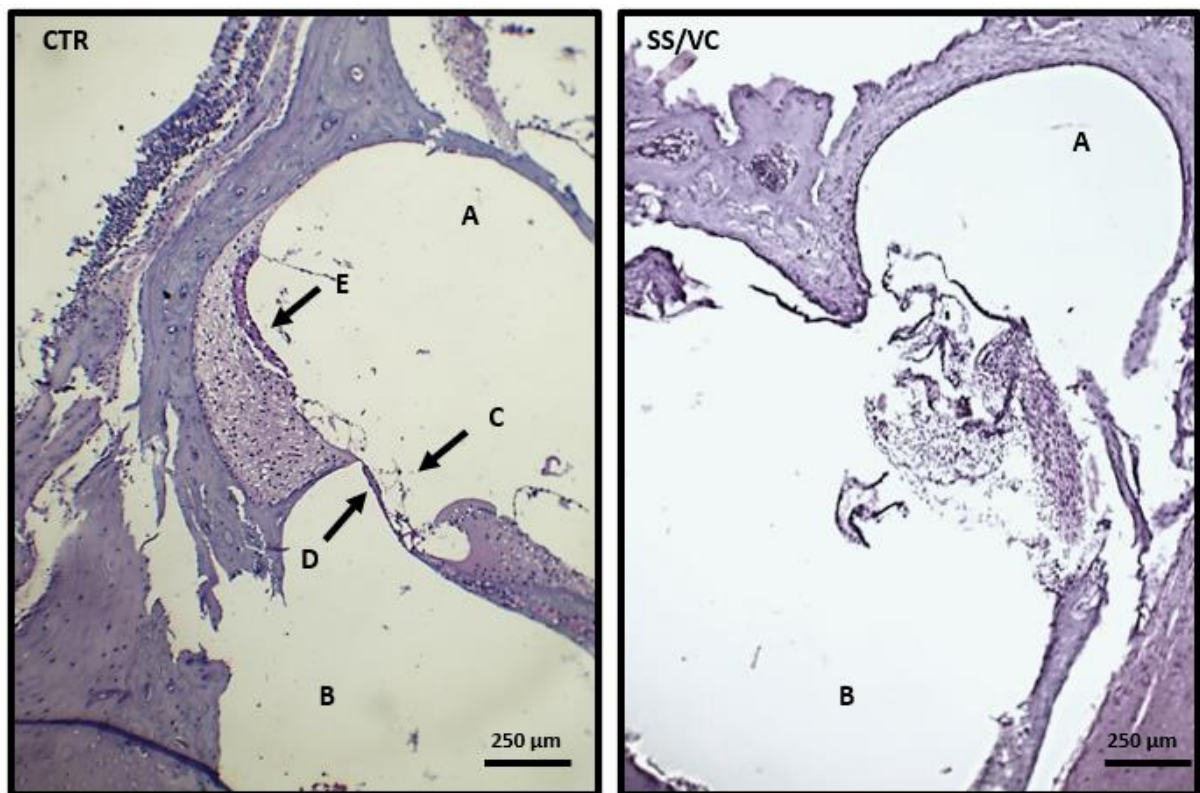


Figura 12 - Secções histológicas transversal do tecido coclear, coradas em HE. Aumentos de 40x nos grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada) e SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada). A: rampa vestibular; B: rampa timpânica; C: órgão de Corti; D: membrana basilar; E: estria vascular. As imagens ilustram a integridade do tecido coclear no grupo CTR e a atrofia do tecido coclear no grupo SS.

O grupo SS/VC (Figura 13B) exibiu notória desestruturação da arquitetura morfológica do órgão de Corti, caracterizada por atrofia de células ciliadas, que se mostravam menores e de diâmetros irregulares, variando entre 6 e 10 μm , assim como aparente hipoplasia, já que mesmo as células ciliadas internas se dispunham em monocamada. Foi observada ainda a perda da relação entre células ciliadas e membrana tectorial (artefatual?). Além disso, o corpo celular da membrana basilar exibia intensa vacuolização pericelular, interpretada como degeneração vacuolar do tipo hidrópica.

O grupo SS/EHPV (Figura 13C), por sua vez, apresentou características morfológicas distintas dos dois grupos anteriores. Neste grupo também foi evidenciada a perda da relação íntima entre membrana tectorial e células ciliadas e aparente atrofia destas últimas (diâmetro variando entre 6 e 10 μm). Contudo, tanto células ciliadas internas quanto externas pareciam se dispor em multicamadas formadas por 3 a 5 fileiras celulares, sugerindo hiperplasia deste componente celular. Além disso, não foi observada degeneração vacuolar hidrópica no corpo celular da membrana basilar.

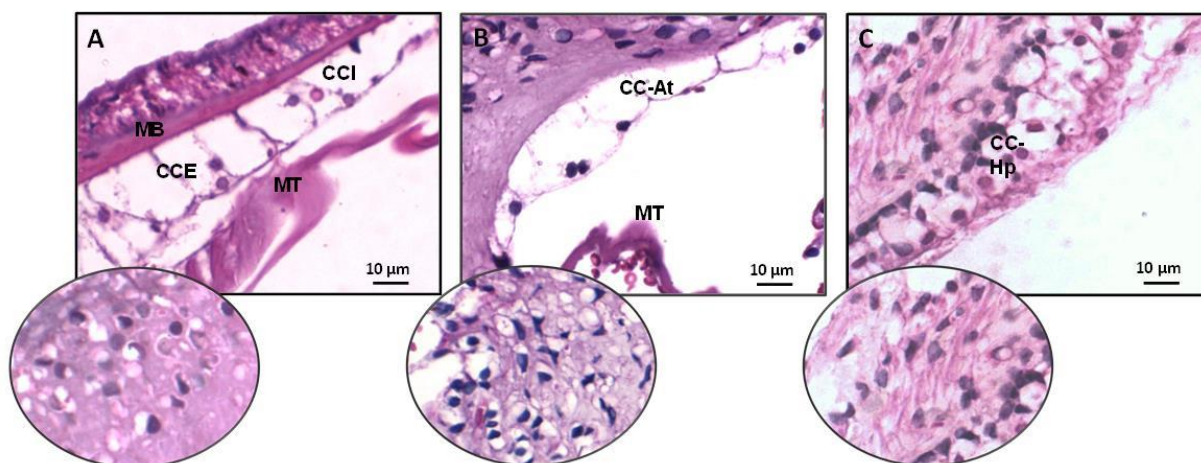


Figura 13 - Secções histológicas transversal do tecido coclear, coradas em HE (800 x), destacando o órgão de Corti. (A) Grupo CTR exibindo células ciliadas internas (CCI) e externas (CCE) apoiadas na membrana basilar (MB) e em íntima relação com a membrana tectorial (MT). Em destaque corpo celular da membrana basilar exibindo características usuais. (B) Grupo SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo tween 80 a 2% em água destilada) apresenta atrofia e hipoplasia de células ciliadas (CC-At), com perda da relação com a membrana tectorial (MT). Em destaque corpo celular da membrana basilar exibindo intensa vacuolização consistente com degeneração hidrópica. (C) Grupo SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg) apresentando aparente hiperplasia de células ciliadas (CC-Hp). Em destaque, corpo celular basilar sem degeneração hidrópica importante.

A análise histomorfológica do núcleo coclear mostrou aumento do volume celular/tumefação nos neurônios do núcleo coclear dorsal e menor ocorrência de outros tipos de neurônios característicos dessa estrutura (unipolares em escova, granulosos), além de citoplasma volumoso em neurônios piramidais no grupo tratado com SS. O grupo SS/EHPV apresentou-se com aspecto similar ao do grupo CTR, com presença de neurônios fusiformes característicos e ampla rede interneurônios: unipolares em escova e granulosos (Figura 14).

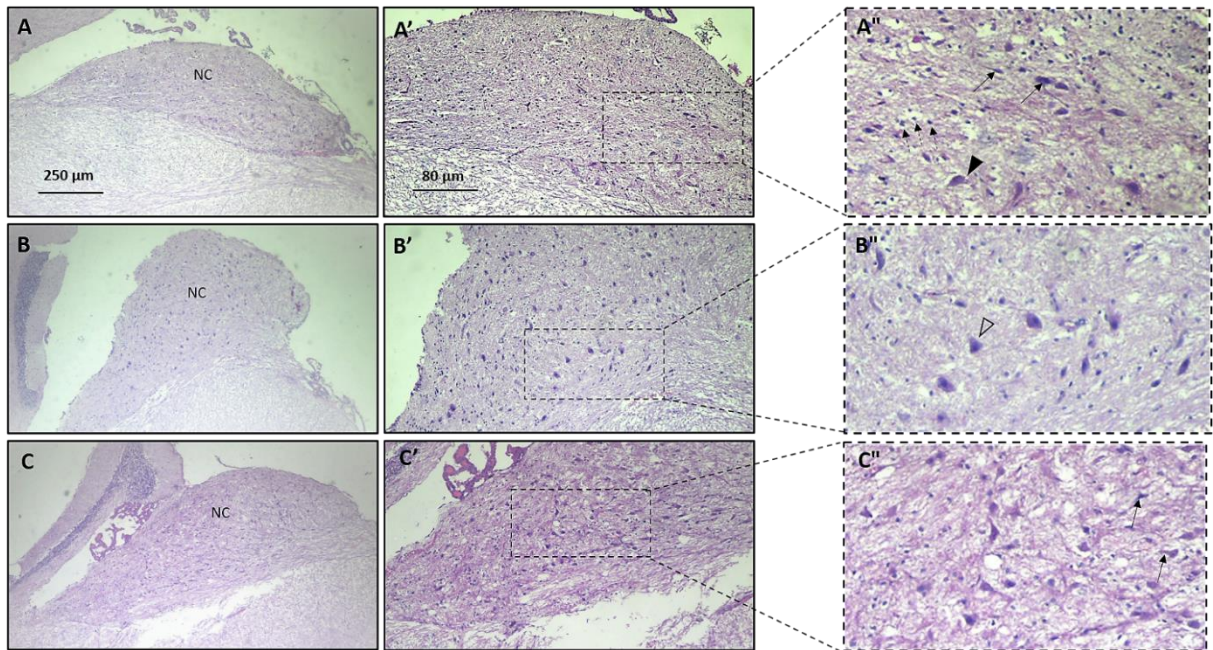


Figura 14 - Fotomicrografias representativas de secções histológicas do núcleo coclear dorsal (NCD) de roedores dos grupos CTR (grupo não lesionado, tratado com água destilada), SS/VC (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com veículo *tween* 80 a 2% em água destilada) e SS/EHPV (grupo lesionado com salicilato de sódio 350 mg/kg, tratado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 30 mg/kg) em aumentos de 40x (A, B e C, respectivamente) e 100x (A', B' e C, respectivamente). Em destaque (região tracejada), observa-se características celulares distintas no grupo SS/VC (B'', citoplasma volumoso em neurônios piramidais – cabeça de seta sem preenchimento) em relação aos demais grupos (A'' e C'', presença de neurônios fusiformes característicos – cabeça de seta preta, e ampla rede interneurônios: unipolares em escova – seta preta – e granulosa – setas tracejadas).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciaram que a administração de SS induziu perda da eletromotilidade de células ciliadas da cóclea e modificações estruturais no núcleo coclear dorsal, bem como diminuição da atividade motora nos animais. Além disso, a administração oral do EHPV a 30 mg/kg diminuiu significativamente os efeitos do SS na via auditiva e os aspectos motores avaliados no teste de campo aberto.

Ao avaliar a orelha média dos roedores foi verificado que não houve alteração da compliância em nenhum dos grupos, de acordo com a classificação de Onusko (2004), e o pico de pressão de ar foi maior que -100 daPa em todos os grupos, indicando curvas timpanométricas normais. Esses dados sugerem que as alterações provocadas pela alta dosagem de salicilato de sódio se limitam a orelha interna, não atingindo a orelha média (RADZIOWON *et al.*, 2015; PACE *et al.*, 2016; JONES; MAY, 2017).

Poucos estudos revelam o valor da compliância e o pico da pressão de ar investigados no exame timpanométrico em roedores. No estudo de Geal-Dor *et al.* (1997), a compliância das orelhas dos ratos albinos adultos variou entre 0,38 e 0,45 mL. Zheng *et al.* (2007) avaliaram ratos adultos e encontraram compliância média de 0,42 mL. No presente estudo não houve diferença estatística significativa entre as orelhas direita e esquerda, concordando com Zhang *et al.* (2012) quando investigaram orelhas médias de camundongos selvagens e de camundongos mutantes com idades entre três semanas e oito meses. A média da compliância variou de 0,25 mL a 0,34 mL no grupo controle e de 0,25 mL a 0,33 mL no grupo mutante.

O zumbido foi induzido nesse estudo utilizando injeção intraperitoneal de salicilato de sódio em roedores, conforme estudos anteriores que mensuraram a indução de zumbido com base em aspectos comportamentais (PACE *et al.*, 2016; JONES, MAY, 2017).

Pace *et al.* (2016) condicionaram ratos a beberem água durante exposição a um ruído ambiental e observaram que os animais que foram submetidos a injeção de 350 mg/kg de SS continuaram bebendo água mesmo sem exposição ao som ambiental. Rüttiger *et al.* (2003) testaram também a dosagem de 150 mg/kg de SS e verificaram que a ação dos animais para beber água foi maior nos animais que receberam 350 mg/kg de SS no mesmo estudo. Assim, a dosagem utilizada no presente estudo foi eficaz para induzir zumbido nos roedores.

Além dos aspectos comportamentais, as amplitudes das respostas medidas através do teste de EOAPD tem sido mapeada em modelos experimentais para estudo do zumbido em roedores. Como a dimensão das orelhas dos roedores é pequena, com comprimento da cóclea de 11 mm, quando comparada aos seres humanos (34 mm) e o alcance de audição dos roedores se estende 1,5 oitavas acima dos humanos (ASHMORE, 2008), o que faz possuírem audição ultrassônica, até 80 kHz, enquanto nos seres humanos o alcance de

audição vai até 20 kHz (MILLIGAN, 1993), são avaliadas as frequências altas em testes de laboratório. Além disto, de acordo com Martin *et al.* (2011), a movimentação das células ciliadas externas nas frequências abaixo de 3 kHz favorece o surgimento de bandas verticais que ocasiona o componente biofísico da audição chamado reflexão, não sendo capaz de originar a distorção. Diante do exposto, as amplitudes de frequências avaliadas no presente estudo foram 6 e 8 kHz. As demais frequências, inclusive 4 kHz, não apresentaram amplitude de respostas originadas pela distorção. No estudo de Ralli *et al.* (2010) o grupo que recebeu SS (300 mg/kg) apresentou no teste EOAPD redução da amplitude nas frequências de 8, 12 e 16 KHz. Outros estudos identificaram que o tratamento agudo com altas doses de SS, semelhante a dosagem utilizada nesse trabalho, promove a redução da amplitude mais evidente em frequências de 4 a 10 kHz (STOLZBERG *et al.*, 2011; 2012).

Adicionalmente, o Maxipost, um modulador da abertura de canais de potássio, mostrou-se protetor frente ao zumbido induzido por SS evitando a perda de amplitude em 6 e 8 kHz (SHEPPARD *et al.*, 2015). Considerando que no presente trabalho também foi observada redução da amplitude em 6 e 8 kHz no grupo tratado com SS, depreende-se que o protocolo escolhido tenha sido eficaz para causar essa alteração, pertinente ao quadro de zumbido em roedores. Vale destacar que a faixa de frequência onde se encontram alterações de registro das EOAPD está relacionada a modificações plásticas na via auditiva, mais especificamente no mapa tonotópico do córtex auditivo primário (aumento da representação cortical do tom do zumbido, determinada pela alteração da entrada sensorial nas células ciliadas da cóclea) (YANAGAWA *et al.*, 2017).

Essa reorganização das redes de transmissão neurais induzida por SS também envolve outras regiões cerebrais, como centros de memória, emoções e de planejamento motor, incluindo o cerebelo e o núcleo caudado/putâmen (CHEN *et al.*, 2014; SALVI *et al.*, 2021). Tais modificações podem estar relacionadas aos achados do teste de campo aberto, em que o grupo SS/VC apresentou diminuição da atividade motora. De fato, em um estudo realizado por Lauer *et al.* (2018), uma menor locomoção no teste de campo aberto foi associada ao maior escore para zumbido em animais tratados com SS. Parâmetros motores no teste de campo aberto estão relacionados à transmissão dopaminérgica nos núcleos da base (antagonistas dopaminérgicos diminuem a locomoção) e, em um estudo recente, Wang *et al.* (2021) observaram que o SS diminuiu os níveis de dopamina no núcleo caudado/putâmen. Quando os autores realizaram a estimulação elétrica deste mesmo núcleo, houve diminuição da hiperatividade de neurônios no córtex auditivo primário (característica do zumbido), o que reforça a ideia de interconexão entre a via auditiva e outros centros de controle.

Por outro lado, no presente trabalho não foram observadas alterações significativas em testes de ansiedade e depressão em relação aos tratamentos utilizados. Da mesma forma, Pace e Zhang (2013) avaliaram roedores com zumbido induzido por ruído e não observaram

sinais de ansiedade nos animais quando utilizaram o teste labirinto em cruz elevado, como também Lauer *et al.* (2018) não observaram alteração emocional quando avaliaram o comportamento de animais com zumbido induzido com SS nos testes campo aberto e labirinto em cruz elevado. Os últimos autores concluíram que para o modelo de indução de zumbido o teste de labirinto em cruz elevado não se mostrou consistente quando realizadas exposições repetidas. Winne *et al.* (2020) encontraram alteração no teste de labirinto em cruz elevado após administração de SS, com resultados indicativos de ansiedade. No entanto, os registros foram tomados apenas 1h após aplicação única de SS, o que pode sugerir que, para esta variável (comportamento emocional), algumas adaptações no protocolo de teste seriam necessárias para elucidar o efeito ansiogênico.

Antidepressivos, sejam clássicos ou drogas mais novas em fase de teste, diminuem o tempo de imobilidade de animais expostos ao nado forçado (O'NEIL; MOORE, 2003), o que não ocorreu no presente estudo. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, indicando ausência de comportamento depressivo no teste comportamental nado forçado. Sabe-se que o baixo nível de serotonina tem relação com a percepção do zumbido (HAN *et al.*, 2021), e como o SS pode ativar os receptores da serotonina, que inibe a depressão (JIN *et al.*, 2015), possivelmente tenha ocorrido nos animais em estudo um aumento desse neurotransmissor, o que não mostrou diferença estatística entre os três grupos, revelando que o SS não provocou estado depressivo nos animais.

Cumprе destacar que o tratamento com EHPV não produziu comportamento ansiogênico ou depressivo nos animais, ao mesmo tempo em que melhorou o desempenho motor no teste de campo aberto em relação ao grupo com zumbido induzido. Esse efeito, associado aos achados do teste de EOAPD, indica que o EHPV foi protetor em relação às alterações produzidas pelo SS.

No presente estudo, a detecção de amplitudes maiores no teste EOAPD em animais tratados previamente com EHPV em comparação com o grupo SS/VC sugere uma ação protetora exercida pelo extrato. Como as emissões otoacústicas avaliam a motilidade das células ciliadas externas, esse resultado mostra que o SS provocou alteração nessas células. Com o estímulo acústico de fraca intensidade ocorrem contrações e alongamentos das células ciliadas externas de área da cóclea. Quando esse movimento induz a inclinação dos cílios das células ciliadas internas ocorre a despolarização dessas células, que provoca a liberação de neurotransmissores no nervo acústico produzindo potencial de ação do nervo, que passa a transmitir a mensagem auditiva ao sistema nervoso central. A energia sonora que emerge das células ciliadas externas é transmitida através dos ossículos e da membrana timpânica para o meato acústico externo, gerando as emissões otoacústicas (AZEVEDO, 2003; DURANTE, 2013; HOTH, BALJIC, 2017). Assim, os resultados elucidam que o SS diminuiu a eletromotilidade das células ciliadas externas no grupo SS/VC e o EHPV protegeu as células

mantendo a movimentação necessária para captar as emissões otoacústicas no grupo SS/EHPV.

Os efeitos do EHPV podem ser explicados à luz dos aspectos etiopatogênicos do zumbido e dos efeitos do SS periférica (cóclea) e centralmente (núcleo coclear dorsal, córtex auditivo e outras áreas como amígdala), que incluem o estresse oxidativo e a resposta inflamatória, bem como a modulação de canais de K⁺ e da transmissão gabaérgica e glutamatérgica (PALL, BEDIANT, 2007; HWANG *et al.*, 2011; SHEPPARD *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo é considerado uma das causas possíveis subjacentes do zumbido em humanos (CELIK; KOYUNCU, 2018; EKINCE; KAMASAK, 2020) e foi verificado que altas doses de SS aumentam a produção de superóxidos *in vitro*, que contribui para a apoptose de neurônios do gânglio espiral (DENG *et al.*, 2013). A ocorrência de apoptose pode estar relacionada à ototoxicidade do SS (lesão às células da cóclea), mediada pela ativação da via caspase-3 (FENG *et al.*, 2010). Também é descrito que drogas ototóxicas podem ativar a enzima sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) (LEE *et al.*, 2020; SHIH *et al.*, 2021) e que o consequente aumento na produção de óxido nítrico leva à ativação de proteínas G, que por sua vez mediam a atividade de proteínas quinases relacionadas ao estresse celular, como MAPK e JNK. O aumento da atividade enzimática acompanha um aumento das concentrações intracelulares de íons cálcio e liberação de citocromo C das mitocôndrias (mediado por proteínas BAX). A liberação de citocromo C ativa, então, caspases 3 que levam à degradação da cromatina nuclear e, também, da membrana celular e de elementos do citoesqueleto (CIORBA *et al.*, 2013).

Assim, é possível que o efeito protetor do EHPV tenha se dado por sua ação antioxidante (CABRAL *et al.*, 2009; FROZZA *et al.*, 2013). Outros estudos que utilizaram produtos naturais com atividade antioxidante, como o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2018; RADUNZ *et al.*, 2020), além de combinações de vitaminas e minerais (PETRIDOU *et al.*, 2019) obtiveram melhora do zumbido, e assim, suportam esta hipótese.

Mais especificamente em relação ao EHPV, estudos mostraram que a administração oral desse extrato pode diminuir a expressão de iNOS (BARBOSA BEZERRA *et al.*, 2017). Além disso, compostos bioativos presentes no extrato como a formononetina (TIAN *et al.*, 2013) e a liquiritigenina (YANG, PARK, SONG, 2013) promoveram diminuição da expressão de BAX e caspase 3 em cultivos de neurônios corticais estimulados por glutamato.

Vale destacar que a ativação de receptores de glutamato em células ciliadas é causada pelo SS, resultando em hiperexcitabilidade (excitotoxicidade) (RUEL *et al.*, 2008). No estudo de Lima-Cavendish *et al.* (2015), os tratamentos com EHPV e com formononetina diminuíram as respostas a dor mediadas por glutamato em ratos. Esse dado é interessante, tendo em vista que inibidores de receptores glutamatérgicos mostraram-se promissores para redução

do zumbido em roedores (XIONG *et al.*, 2019). Em um estudo mais recente, Wang *et al.* (2019) relataram que a formononetina diminuiu a inflamação e a hiperexcitabilidade neuronal na amígdala basolateral de roedores, atenuando o aumento do número de receptores para GABA e glutamato induzidas por lesão excitotóxica. Além de permitir especular o mecanismo protetor do EHPV encontrado no presente estudo, abre-se um desdobramento para estudo da possível modulação de regiões do sistema límbico que se conectam à via auditiva.

Níveis de TNF- α e IL-1 β também aumentam na cóclea e no colículo inferior após administração de SS em roedores e tais citocinas pró-inflamatórias podem estar diretamente relacionadas ao zumbido ou podem produzir o zumbido através da modulação de receptores de glutamato tipo NMDA (HWANG *et al.*, 2011). Neste sentido, tanto o extrato de própolis vermelha brasileira (Bueno-Silva *et al.*, 2016; 2017; LIMA-CAVENDISH *et al.*, 2015) quanto os principais marcadores químicos desta variedade de própolis, como a formononetina (LI *et al.*, 2018) e o vestitol (BUENO-SILVA *et al.*, 2020), foram eficazes em diminuir respostas inflamatórias mediadas por tais citocinas.

O pressuposto de ototoxicidade mediada pelo SS é reforçado pela análise histológica da cóclea, que evidenciou desestruturação do órgão de Corti com atrofia das células ciliadas, além de degeneração vacuolar do tipo hidrópica no corpo celular da membrana basilar do grupo SS. A hiperplasia de células ciliadas internas e externas observada em multicamadas se deu possivelmente pela ação compensatória a atrofia das células gerada pelo efeito protetor do EHPV sobre a ação do SS. Também se observou no grupo SS/EHPV ausência da degeneração vacuolar hidrópica no corpo celular da membrana basilar ocorrida no grupo SS/VC. O resultado encontrado nesse estudo concorda com pesquisadores que mostram que antioxidantes são benéficos para o sistema auditivo. A ação do antioxidante *radix astragali* foi verificado por Xiong *et al.* (2015) quando melhorou a expressão das proteínas Cx26 e KCNQ1 na estria vascular e houve menor perda de células ciliadas no órgão de Corti de porcos expostos a ruído.

Özdemir *et al.* (2019) avaliaram cócleas de roedores tratados com cisplatina, conhecida por sua ação ototóxica, e observaram degeneração da estrutura do tecido coclear. Verificaram membrana tectorial engrossada com morfologia normal, membrana de Reissner com edema intersticial, degeneração vacuolar hidrópica, inclusive de células ciliadas externas e internas; células da estria vascular e do ligamento espiral com vacuolização e degeneração celular. No mesmo estudo os pesquisadores avaliaram o efeito protetor do extrato uva-do-monte, contra a ototoxicidade da cisplatina. Observaram que os achados de degeneração do grupo tratado com uva-do-monte não foram graves como os do grupo cisplatina, sugerindo efeito protetor da uva-do-monte, pela redução do estresse oxidativo.

Chang *et al.* (2018) avaliaram cócleas de roedores tratados com ácido 3-nitropropiónico (3-NP), indutor de perda auditiva por estresse oxidativo, e verificaram ação protetora do

extrato de *Ginkgo biloba* EGb 761, um antioxidante conhecido pelo efeito otoprotetivo. Verificaram que os fibrócitos tipo II do ligamento espiral foram preservados no grupo tratado com EGb + 3-NP quando comparados ao grupo tratado apenas com 3-NP. Os fibrócitos são importantes para a manutenção da endolinfa, presente no ducto coclear (FUJINAMI *et al.*, 2010).

Além das estruturas já mencionadas, cóclea e córtex auditivo, o núcleo coclear dorsal (NCD) tem sido descrito como uma estrutura com participação na gênese e modulação do zumbido. Foram descritas modificações na ativação da expressão gênica, alterações plásticas (funcionais) e morfológicas em neurônios do NCD. A hiperatividade, ou seja, o aumento da frequência de disparos nas vias auditivas (NCD, colículo inferior e córtex auditivo), induzida por SS ou exposição ao ruído, é atualmente considerada uma das principais características fisiopatológicas do zumbido (BROZOSKI *et al.*, 2017; MARTEL *et al.*, 2019).

A perda da aferência sensorial provinda da cóclea parece ser o “gatilho” para modificações plásticas, mas a mudança no padrão de atividade neuronal no NCD teria um papel de destaque na manutenção do zumbido. O aumento do volume celular/tumefação nos neurônios do NCD encontrado no presente trabalho pode ser indicativo de estado de metabolismo aumentado, que seria coerente com o pressuposto de hiperatividade celular. Ao mesmo tempo, uma menor ocorrência de outros tipos de neurônios característicos dessa estrutura (unipolares em escova, granulosos) no grupo tratado com SS, pode refletir modificações plásticas nos circuitos neuronais. Alguns desses interneurônios têm um importante papel no balanço excitação-inibição dos neurônios fusiformes, que são os principais neurônios de projeção do NCD (BAIZER *et al.*, 2012). De fato, Zugaib *et al.* (2016) mostraram que um mecanismo de ação do SS para indução de zumbido é a diminuição da inibição gabaérgica modulada pelos neurônios unipolares em escova. Salvi *et al.* (2021) acrescentam que o zumbido induzido por SS interrompe uma rede neural que envolve centros auditivos e não auditivos e tem relação com o sistema límbico, conforme o modelo neurofisiológico de Jastreboff (1990).

A hiperatividade celular sugerida neste estudo concorda com Wallhausser-Franke *et al.* (2003) e com Santos *et al.* (2017), pois os autores encontraram marcação mais intensa de c-fos, um marcador funcional, no núcleo coclear e no colículo inferior de roedores com zumbido induzido por SS, nas dosagens de 350 mg/kg e 300 mg/kg, respectivamente. Da mesma forma, Zheng *et al.* (2006) encontraram aumento significativo de neurônios do núcleo coclear ventral e uma tendência para maior número de neurônios do NCD de roedores com zumbido induzido por 350 mg/kg de SS, sugerindo que o aumento da expressão nNOS em neurônios do núcleo coclear é um importante neuromodulador do zumbido.

No grupo SS/EHPV observou-se aspecto similar ao do grupo CTR. Pode-se sugerir que o efeito protetor do EHPV sobre as células ciliadas do órgão de Corti preveniu o “gatilho”

(perda da aferência sensorial primária), ou o desenvolvimento do processo, que poderia gerar alterações na estrutura e função do NCD. Ao mesmo tempo, estudos anteriores mostraram que o EHPV e seus componentes bioativos, como a formononetina, têm ação no sistema nervoso central (BARBOSA *et al.*, 2016; DOS SANTOS, 2018; BARROSO, 2019), inclusive sobre processos plásticos, como a memória (FEI *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2019). Desta forma, o EHPV pode ter contribuído para preservar estruturas das células neuronais do núcleo coclear, minimizando os danos causados pelo SS.

7 CONCLUSÃO

O SS induziu diminuição da eletromotilidade de células ciliadas da cóclea nas frequências de 6 kHz e 8 kHz e este efeito foi atenuado pelo EHPV;

Houve diminuição da atividade exploratória motora nos animais com zumbido induzido e este efeito não foi observado nos roedores tratados com EHPV. Não houve alteração emocional, semelhante a ansiedade e depressão, nos grupos avaliados;

O tratamento com SS promoveu alterações estruturais na cóclea, enquanto no tratamento com EHPV foi verificada hiperplasia compensatória a atrofia de células ciliadas internas e externas do órgão de Corti e ausência de degeneração vacuolar hidrópica no corpo celular da membrana basilar;

O núcleo coclear dorsal de animais tratados com SS mostrou alterações sugestivas de mudanças da atividade neuronal e no tipo celular predominante, enquanto houve preservação da citoarquitetura do núcleo coclear dos roedores tratados com EHPV.

Portanto, conclui-se que o EHPV apresentou efeito protetor sobre o zumbido induzido por SS em roedores.

REFERÊNCIAS

- AFIF, A.A.; ALAMOUDI, U.; AL-SAYED, A.A.; BANCE, M. Multiple Venous Malformations as a Cause of Pulsatile Tinnitus Case Rep Otolaryngol 2020; 2020: 8867963.
- AHSAN, S.F.; SEIDMAN, M.; YAREMCHUK, K. What Is the Best Imaging Modality in Evaluating Patients with Unilateral Pulsatile Tinnitus? The Laryngoscope 2015; 125(2): 284-285.
- AHMAD, N.; SEIDMAN, M. Tinnitus in the Older Adult - Epidemiology, Pathophysiology and Treatment Options. Drugs and Aging 2004; 21(5): 297-305.
- ALMEIDA L.D.; MITRE E.I.; LEMOS L.; SIMÕES E.C.C. Vestibulometria em indivíduos com zumbido e exames audiológicos normais. Rev CEFAC 2005; 7(3): 382-87.
- ANDRADE, J.K.S.; DENADAI, M.; OLIVEIRA, C.S.; NUNES, M.L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast região. Food Research International 2017; 101:129–138.
- ASHMORE, J. Cochlear outer hair cell motility. Physiological Reviews. 2008; 88(1): 173–210.
- AVATO, P.; ARGENTIERI, M. Plant biodiversity: phytochemicals and health. Phytochem Rev 2018; 17:645–656.
- AVOGLIO, J.L.V. Dental occlusion as one cause of tinnitus. Medical Hypotheses 2019; 130:109280.
- AZEVEDO, M.F. Emissões Otoacústicas. In: FIGUEIREDO, M.S. Emissões Otoacústicas e BERA. São José dos Campos: Pulso, 2003. p. 35-84.
- BAIZER, J.S.; MANOHAR, S.; PAOLONE, N.A.; WEINSTOCK, N.; SALVI, R.J Understanding tinnitus: the dorsal cochlear nucleus, organization and plasticity Brain Res. 2012; 16(1485): 40–53. doi:10.1016/j.brainres.2012.03.044.
- BANKOVA, V.B.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 2000; 31(1): 3-15.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev. Nutr. 2010; 23(4):629-643.
- BARBOSA, R.A.; NUNES, T.L.G.M.; MAGALHÃES NUNES, T.L.G.M.; PAIXÃO, A.O.; BELO NETO, R.; MOURA, S. *et al.* Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. Pharmaceutical Biology 2016; 54(6): 993-1004.
- BARBOSA BEZERRA, G.; DE MENEZES DE SOUZA, L.; DOS SANTOS A.S.; DE ALMEIDA, G.K.; SOUZA, M.T.; SANTOS, S.L. *et al.* Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. Biomed Pharmacother 2017; 85:687-696.
- BARROSO, S.S. *Efeitos do tratamento oral com extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sobre as discinesias induzidas por l-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) em ratos, Sergipe – Brasil* [Tese]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2019.

BATISTA, C.M.; ALVES, A.V.F.; QUEIROZ, L.A.; LIMA, B.S.; PEREIRA-FILHO, R.N.; ARAÚJO, A.A.S. *et al.* The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *Journal of Photochemistry & Photobiology* 2018; 180: 198-207.

BERNHARDT, O.; MUNDT, T.; WELK, A.; KÖPPL, N.; KOCHER, T.; MEYER, G. *et al.* Signs and symptoms of temporomandibular disorders and the incidence of tinnitus. *J Oral Rehabil* 2011; 38(12):891-901.

BEUKES; E.W.; BAGULEY, D.M.; JACQUEMIN, L.; LOURENCO, M.P.C.G.; ALLEN, P.M.; ONOZUKA, J. *et al.* Changes in Tinnitus Experiences During the COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Public Health* 2020; 8:592878. doi: 10.3389/fpubh.2020.592878.

BHATT, J.M.; LIN, H.W.; BHATTACHARYYA, N. Prevalence, Severity, Exposures, and Treatment Patterns of Tinnitus in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. doi:10.1001/jamaoto.2016.1700

BOGER, M.E.; SAMPAIO, A.L.L.; OLIVEIRA, C.A.C.P. Analysis of Hearing and Tinnitus in Workers Exposed to Occupational Noise. *International Tinnitus Journal*. 2016;20(2):88-92.

BOUSEMA, E.J.; KOOPS, E.A.; DIJK, P.V.; DIJKSTRA, P.U. Association Between Subjective Tinnitus and Cervical Spine or Temporomandibular Disorders: A Systematic Review. *Trends in Hearing*. 2018; 22:1-15.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C.F.; DENNY, C.; COLÓN, D.F.; CUNHA, T.M. *et al.* Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Phytomedicine* 2016; 23(13):1583-1590. doi: 10.1016/j.phymed.2016.09.009.

BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMO, S. E.; CASARIN, R.C.V.; SEVERINO, E.; ALENCAR, M.S. *et al.* Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 207(31):100-107.

BUENO-SILVA, B.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; MAYER, M.P.A. Vestitol drives LPS-activated macrophages into M2 phenotype through modulation of NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol* 2020; 82:106329. 10.1016/j.intimp.2020.106329

BROZOSKI, T; BROZOSKI, D.; WISNER, K.; BAUER, C. Chronic tinnitus and unipolar brush cell alterations in the cerebellum and dorsal cochlear nucleus. *Hearing Research* 2017; 350:139-151.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quím. Nova* 2009; 32(6): 1523-1527.

CAIEIRO, D. M.; MARCUCCI, M. C. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Formulations containing *Ginkgo biloba* L. *Revista Fitos* 2010; 5(3): 64-72.

CAO, X.J.; LIN, L.; SUGDEN, A.U.; CONNORS, B.W.; OERTEL, D. Nitric Oxide-Mediated Plasticity of Interconnections Between T-Stellate cells of the Ventral Cochlear Nucleus Generate Positive Feedback and Constitute a Central Gain Control in the Auditory System. *J Neurosci*. 2019; 39(31):6095-6107. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0177-19.2019.

CAZALS, Y. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62:583-31.

- CELIK, M.; KOYUNCU, I. A Comprehensive Study of Oxidative Stress in Tinnitus Patients. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2018; 70(4):521–526.
- CHANG, M.Y.; RHEE, J.; KIM, S.H.; KIM, Y.H. The Protective Effect of Egb 761 Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Hearing Loss: The Role of Sirtuin 1. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 2018; 11(1): 9-16.
- CHEN, G.; RADZIOWON, K.E.; KASHANIAN, N.; MANOHAR, S.; SALVI, R. Salicylate-Induced Auditory Perceptual Disorders and Plastic Changes in Nonclassical Auditory Centers in Rats. *Neural Plasticity* 2014; v.2014. ID 658741, 18p. [dx.doi.org/10.1155/2014/658741](https://doi.org/10.1155/2014/658741)
- CIORBA, A.; BIANCHINI, C.; PASTORE, A.; MAZZOLI, M. Pathogenesis of Tinnitus: Any Role for Oxidative Stress? *Journal of International Advanced Otology*. 2013; 9(2):249–254.
- COELHO, C.B.; SANTOS, R.; CAMPARA, K.F.; TYLER, R. Classification of tinnitus multiple causes with the same name. *Otolaryngol Clin N Am* 2020; doi.org/10.1016/j.otc.2020.03.015.
- COOMBER, B.; KOWALKOWSKI, V.L.; BERGER, J.I.; PALMER, A.R.; WALLACE, M.N. Modulating central gain in tinnitus: changes in nitric oxide synthase in the ventral cochlear nucleus. *Front Neurol*. 2015; 6:53. doi: 10.3389/fneur.2015.00053.
- CORREA, B. M.; SILVEIRA, A. F.; BONFANTE, D.; COSTA, M.J.; BIAGGIO, E.P.V. Habits and hearing complaints of teenagers users of personal stereos. *Revista CEFAC*. 2016; 18(2):348-354.
- CÔTÉ, C.; BARIL, I.; MORENCY, C.; MONTMINY, S.; COUTURE, M.; LEBLOND, J. *et al.* Long-Term Effects of a Multimodal Physiotherapy Program on the Severity of Somatosensory Tinnitus and Identification of Clinical Indicators Predicting Favorable Outcomes of the Program. *J Am Acad Audiol*. 2019; 30:720–730.
- CUI, W.; WANG, H.; CHENG, Y.; MA, X.; LEI, Y.; RUAN, X. *et al.* Long-term treatment with salicylate enables NMDA receptors and impairs AMPA receptors in C57BL/6J mice inner hair cell ribbon synapse. *Molecular Medicine Reports*. 2019; 19:51-58.
- DANTAS, C.G.; NUNES, T.L.G.M.; NUNES, T.L.G.M.; PAIXÃO, A.O.P.; REISA, F.P.; DE LUCCA JÚNIOR, W. *et al.* Pharmacological evaluation of bee venom and melittin. *Rev Bras Farmacogn* 2014; 24: 67-72.
- DANTAS SILVA, R.P.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE* 2017; 12(3): e0172585. doi.org/10.1371/journal.pone.0172585.
- DA SILVA, R.O.; ANDRADE, V.M.; RÊGO, E.S.B.; DÓRIA, G.A.A.; LIMA, B.S.; SILVA, F.A. *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 170:66–71.
- DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2008; 5(4): 435-441.
- DEHMEL, S.; PRADHAN, S.; KOEHLER, S.; BLEDSOE, S.; SHORE, S. Noise overexposure alters long-term somatosensory-auditory processing in the dorsal cochlear nucleus--possible basis for tinnitus-related hyperactivity? *J Neurosci*. 2012; 32(5):1660-1671. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4608-11.2012

DELANEY, T.M.; HELVEY, J.T.; SHIFFERMILLER, J.F. A Case of Salicylate Toxicity Presenting with Acute Focal Neurologic Deficit in a 61-Year-Old Woman with a History of Stroke. *American Journal of Case Reports* 2020; 21: e920016. doi: 10.12659/AJCR.920016.

DE MENDONCA, I. C.; PORTO, I. C.; DO NASCIMENTO, T. G.; SOUZA, N. S.; OLIVEIRA, J. M.; ARRUDA, R. E. *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary Alternative Medicine* 2015; 15 (357): 1-12.

DENG, L.; DING, D.; SU, J.; MANOHAR, S.; SALVI, R. Salicylate Selectively Kills Cochlear Spiral Ganglion Neurons by Paradoxically Up-regulating Superoxide. *Neurotox Res* 2013; 24:307–319.

DOS SANTOS, F.S.M. *Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha e da formononetina após lesão medular espinal em roedores, Sergipe – Brasil* [Tese]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2018.

DREXLER, D.; LOPEZ-PAULLIER, M.; RODIO, S.; GONZÁLEZ, M.; GEISINGER, D.; PEDEMONTE, M. Impact of reduction of tinnitus intensity on patients' quality of life *International Journal of Audiology* 2016; 55: 11–19.

DURANTE, A.S. Emissões Otoacústicas. In: BEVILACQUA, M.C.; MARTINEZ, M.A.N.; BALEN, S.A.; PUPO, A.C.; REIS, A.C.M.B.; FROTA, S. *Tratado de Audiologia*. Santos: Santos Editora, 2013. p. 145-158.

DURNAS, C.; CUSACK, B.J. Salicylate intoxication in the elderly. Recognition and recommendations on how to prevent it. *Drugs Aging* 1992; 2: 20–34.

EKINCE, A.; KAMASAK, K. Evaluation of serum prolidase enzyme activity and oxidative stress in patients with tinnitus. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020; 86(4): 405-410.

ESMAILI, A.A.; RENTON, J. A review of tinnitus. *Australian Journal of General Practice.* 2018; 47(4): 205-208.

FEI, H.; ZHANG, Y.; LIU, T.; ZHANG, X.; WU, S. Neuroprotective effect of formononetin in ameliorating learning and memory impairment in mouse model of Alzheimer's disease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2018; 82(1):57–64. doi.org/10.1080/09168451.2017.1399788.

FENG, H.; YIN, S.; TANG, A.; CAI, H.; CHEN, P.; TAN, S. *et al.* Caspase-3 activation in the guinea pig cochlea exposed to salicylate. *Neurosci Lett* 2010; 479(1):34-9. 10.1016/j.neulet.2010.05.023

FIGUEIREDO, R.R.; AZEVEDO, A.A. Introdução, epidemiologia e classificações. In: Zumbido. Rio de Janeiro: Revinter, 2013a. p. 1-4.

FIGUEIREDO, R.R.; AZEVEDO, A.A. Propedêutica em zumbido. In: Zumbido. Rio de Janeiro: Revinter, 2013b. p. 16-24.

FREDRICH, M.; ZEBER, A.C.; HILDEBRANDT, H.; LLLING, R.B. Differential molecular profiles of astrocytes in degeneration and re-innervation after sensory deafferentation of the adult rat cochlear nucleus. *Eur J Neurosci* 2013; 38(1):2041-56.

FROTA, S. Avaliação básica da audição. In: FROTA, S. *Fundamentos em fonoaudiologia: audiologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 41-60.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O.; SALVADO, M.; MOURA, S. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 52: 137-142.

FU, X.; QIN, T.; YU, J.; JIAO, J.; MA, Z.; FU, Q. *et al.* Formononetin Ameliorates Cognitive Disorder via PGC-1 α Pathway in Neuroinflammation Conditions in High-Fat Diet-Induced Mice. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2019; 18(7):566-577. doi: 10.2174/1871527318666190807160137.

FUJINAMI, Y.; MUTAI, H.; KAMIYA, K.; MIZUTARI, K.; FUJII, M.; MATSUNAGA, T. Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochemistry International* 2010; 56:487–494.

GEAL-DOR, M.; KHVOLES, R.; SOHMER, H. Cooling induces a decrease in middle ear compliance. *Journal of Basic & Clinical Physiology & Pharmacology* 1997; 8(7): 127-132.

GEOCZE, L.; MUCCI, S.; ABRANCHES, D.C.; MARCO, M.A.; PENIDO, N.O. Systematic review on the evidences of an association between tinnitus and depression. *Braz J Otorhinolaryngology* 2013; 79(1):106-11.

GIBRIN, P.C.D.; MELO, J.J.; MARCHIORI, L.L.M. Prevalência de queixa de zumbido e prováveis associações com perda auditiva, diabetes mellitus e hipertensão arterial em pessoas idosas. *CoDAS* 2013; 25(2):176-80.

GRENHO, L.; BARROS, J.; FERREIRA, C.; SANTOS, V. R.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. *et al.* In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. *Biomed Mater.* 2015; 10(2):1-8.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934; 18:385-403.

HAN, B.I.; LEE, H.W.; RYU, S.; KIM, J. Tinnitus Update. *J Clin Neurol* 2021;17(1):1-10.

HEMAN-ACKAH, S.E.; JUHN, S.K.; HUANG, T.C.; WIEDMANN, T.S. A combination antioxidant therapy prevents age-related hearing loss in C57BL/6 mice. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery.* 2010; 143: 429-434.

HENLEY C.M.; OWINGS, M.H.; STAGNER, B.B.; MARTIN, G.K.; , LONSBURY-MARTIN, B.L. Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear Res* 1990; 43(2-3):141-8. doi: 10.1016/0378-5955(90)90223-c.

HOTH, S.; BALJIC, I. Current audiological diagnostics. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 2017; 16:1-41.

HWANG, J.; CHEN, J.; YANG, S.; WANG, M.; CHAN, Y. Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β genes in the cochlea and inferior colliculus in salicylate-induced tinnitus. *Journal of Neuroinflammation* 2011; 8:30. doi: 10.1186/1742-2094-8-30.

INOUE, H.T.; DE SOUSA, E.A.; ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal* 2007; 15(2): 65-69.

JALILVAND, H.; POURBAKHT, A.; HAGHANI, H. Hearing Aid or Tinnitus Masker: Which One Is the Best Treatment for Blast-Induced Tinnitus? The Results of a Long-Term Study on 974 Patients. *Audiol Neurotol* 2015; 20:195–201.

JASTREBOFF, P. J. Phantom auditory perception (tinnitus): mechanisms of generation and perception. *Neurosci. Res.* 1990; 8:221–254.

JASTREBOFF, P. J.; HAZELL, J. W. A neurophysiological approach to tinnitus: clinical implications. *Br. J. Audiol.* 1993; 27:7–17.

JERGER, J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch Otolaryngology* 1970; 92(4):311-24.

JIN, Y.; LUO, B.; SU, Y.Y.; WANG, X.X.; CHEN, L.; WANG, M. *et al.* Sodium Salicylate Suppresses GABAergic Inhibitory Activity in Neurons of Rodent Dorsal Raphe Nucleus. *PLoS ONE* 2015; 10(5): e0126956. doi: 10.1371/journal.pone.0126956

JONES, A.; MAY, B.J. Improving the Reliability of Tinnitus Screening in Laboratory Animals. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 2017; 18: 183–195.

KAPPEL, V.; MORENO, A.C.P.; BUSS, C.H. Plasticity of the auditory system: theoretical considerations. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011; 77(5):670-674.

KARAASLAN, O.; KANTEKIN, Y.; HACIMUSALAR, Y.; DAĞISTAN, H. Anxiety sensitivities, anxiety and depression levels, and personality traits of patients with chronic subjective tinnitus: a case-control study. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* 2020; DOI: 10.1080/13651501.2020.1757117

KIM, D.K.; PARK, S.N.; KIM, M.J.; LEE, S.Y.; PARK, K.H.; YEO, S.W. Tinnitus in patients with chronic otitis media before and after middle ear surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011; 268:1443–1448.

KIM, H.C.; JANG, C.H.; KIM, Y.Y.; SEONG, J.Y.; KANG, S.H.; CHO, Y.B. Role of preoperative air-bone gap in tinnitus outcome after tympanoplasty for chronic otitis media with tinnitus. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2018; 84(2):173-177.

KIM, T.S.; LEE, H.S.; CHUNG, J.W. The Effect of Korean Red Ginseng on Symptoms and Quality of Life in Chronic Tinnitus: A Randomized, Open-Label Pilot Study. *J Audiol Otol* 2015; 19(2):85-90.

KOEHLER, S.D.; SHORE, S.E. Stimulus timing-dependent plasticity in dorsal cochlear nucleus is altered in tinnitus. *J Neuroscience* 2013; 33(50): 19647-56.

KRATZ, J.M.; TERRAZAS, C.B.; MOTTA, M.J.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. Determinação da composição química e dos perfis de dissolução *in vitro* de medicamentos à base de *Ginkgo biloba* disponíveis no mercado brasileiro. *Latin American Journal of Pharmacy* 2008; 27 (5): 674-680.

KRAUSS, P.; TZIRIDIS, K.; BUERBANK, S.; SCHILLING, A. SCHULZE, H. Therapeutic Value of Ginkgo biloba Extract EGb 7611 in an Animal Model (*Meriones unguiculatus*) for Noise Trauma Induced Hearing Loss and Tinnitus. *PLoS ONE* 2016; 11(6): e0157574. doi: 10.1371/journal.pone.0157574.

LANGGUTH, B.; ELGOYHEN, A.B. Current pharmacological treatments for tinnitus. *Expert Opin. Pharmacother.* 2012; 13(17).

LANGGUTH, B.; KREUZER, P.M.; KLEINJUNG, T.; RIDDER, D. Tinnitus: causes and clinical management. *Lancet Neurol* 2013; 12: 920–30.

LAUER, A.M.; LARKIN, G.; JONES, A.; MAY, B.J. Behavioral Animal Model of the Emotional Response to Tinnitus and Hearing Loss. *Journal of the Association for Research Otolaryngology* 2018; 19(1): 67-81.

LEAVER, A. M.; SEYDELL-GREENWALD, A.; RAUSCHECKER, J. P. Auditory–limbic interactions in chronic tinnitus: challenges for neuroimaging research. *Hear Res.* 2016; 334:49–57.

LEAVER, A. M.; SEYDELL-GREENWALD, A.; TURESKY, T.K.; MORGAN, S.; KIM, H.J.; Rauschecker, J.P. Cortico-limbic morphology separates tinnitus from tinnitus distress. *Frontiers in systems neuroscience.* 2012; 6(21):1-14.

LEE, C.H.; LEE, D.H.; LEE, S.M.; KIM, S.Y. Otoprotective Effects of Zingerone on Cisplatin-Induced Ototoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21:3503. doi:10.3390/ijms21103503.

LE PRELL, C.G.; DOLAN, D.F.; BENNETT, D.C.; BOXER, P.A. Nutrient plasma levels achieved during treatment that reduces noise-induced hearing loss. *Translational Research* 2011;158(1):54-70.

LIANG, K.; YE, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J.; LI, C. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway. *J Neurol Sci* 2014; 344(1-2):100-4. doi: 10.1016/j.jns.2014.06.033.

LI, Z.; ZENG, G.; ZHENG, X.; WANG, W.; LING, Y.; TANG, H. *et al.* Neuroprotective effect of formononetin against TBI in rats via suppressing inflammatory reaction in cortical neurons. *Biomed Pharmacother* 2018; 106:349-354. 10.1016/j.biopha.2018.06.041

LIMA-CAVENDISH, R.L.; SANTOS, J.S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; DE ARAUJO, E.D. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol* 2015; 173:127-33.

LIN, F.R.; THORPE, R.; GORDON-SALANT, S.; FERRUCCI, L. Hearing Loss Prevalence and Risk Factors Among Older Adults in the United States. *Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011, 66A (5): 582–590.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognósia*, v. 17, p. 388-395, 2007.

LOPEZ, B. G.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry* 2014; 1(146): 174-80.

LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2006; 7:22-31.

LOTTI, C.; FERNANDEZ, MC.; PICCINELLI, AL.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, IM.; RASTRELLI, L. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58(4): 2209–2213.

MACHADO, B.A.S.; DANTAS SILVA, R.P.; BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS ONE* 2016; 11(1): e0145954. doi:10.1371/journal.pone.0145954.

MAHMOUDIAN-SANI, M.R.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M. ASADI-SAMANI, M.; LUTHER, T. A Review of Medicinal Plants for the Treatment of Earache and Tinnitus in Iran. *International Tinnitus Journal* 2017; 21 (1): 44-49a.

MAHMOUDIAN-SANI, M.R.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; ASADI-SAMANI, M.; YANG, Q. Ginkgo biloba in the treatment of tinnitus: An updated literature review. *International Tinnitus Journal* 2017; 21(1): 58-62b.

MAKAR, S.K.; MUKUNDAN, G.; GORE, G. Treatment of Tinnitus: A Scoping Review. *International Tinnitus Journal* 2017;21(2):144-156.

MANCHE, S.K.; MADHAVI, J.; MEGANADH, K. R.; JYOTHY, A. Association of tinnitus and hearing loss in otological disorders: a decade-long epidemiological study in a South Indian population. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2016. dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.11.007.

MAO, J.C.; PACE, E.; PIEROZYNSKI, P.; KOU, Z.; SHEN, Y.; VANDEVORD, P. *et al.* Blast-induced tinnitus and hearing loss in rats: behavioral and imaging assays. 2012; *J. Neurotrauma* 29: 430-444.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêutica dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19 (5), p.529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, VS.; DE CASTRO, SL.; DANTAS, AP. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74 (2), p.105-112, 2001.

MARTEL, D.T.; PARDO-GARCIA, T.R.; SHORE, S.E. Dorsal Cochlear Nucleus Fusiform-cell Plasticity is Altered in Salicylate-induced Tinnitus. *Neurociência* 2019; 407: 170-181. doi: 10.1016 / j.neuroscience.2018.08.035.

MARTIN, G. K.; STAGNER, B.B; CHUNG, Y.S.; LONSBURY-MARTIN, B.L. Characterizing distortion-product otoacoustic emission components across four species. *J Acoust Soc Am.* 2011; 129-5:3090–3103.

MARTINEZ, A.D.; ACUNA, R.; FIGUEROA, V.; MARIPILLAN, J.; NICHOLSON, B. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(2):309-22.

MCFERRAN, D.J.; STOCKDALE, D.; HOLME, R.; LARGE, C.H.; BAGULEY, D.M. Why Is There No Cure for Tinnitus? *Frontiers in Neuroscience* 2019; 13:802. doi: 10.3389/fnins.2019.00802.

MENDONÇA, A.K.R.H.; JESUS, C.V.F.; CARVALHO, F.M.A.; FERRARI, Y.A.C.; NARDELLI, M.J.; LEÃO, S.C. *et al.* Regenerative Hepatic Effect of Red Propolis Extract Administration After Partial Hepatectomy in Rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2020; 30:683–692a.

MENDONÇA, M.A.A.; RIBEIRO, A.R.S.; LIMA, A.K.; BEZERRA, G.B.; PINHEIRO, M.S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C. *et al.* Red Propolis and Its Dyslipidemic Regulator

Formononetin: Evaluation of Antioxidant Activity and Gastroprotective Effects in Rat Model of Gastric Ulcer. *Nutrients* 2020; 12:2951b; doi:10.3390/nu12102951.

MICHELAN, C.M.; MICHELAN, L.D.; DE PAULA, H.M.G.; HOSHINO, K. Imobilidade Tônica e Imobilidade do Nado Forçado em Cobaías. *Revista de Etologia* 2006; 8(2):89-95.

MILLIGAN, S. R.; SALEST, G. D.; KHIRNYKH, K. Sound Levels in Rooms Housing Laboratory Animals: An Uncontrolled Daily Variable. *Physiology & Behavior* 1993; 53:1067-1076.

MONZOTE, L.; CUESTA RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C.; HERNANDEZ, M. I.; FRAGA, J.; PEREZ, K. *et al.* In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *MEM INST OSWALDO CRUZ* 2012; 107(8).

MÜLAZIMOĞLU, S.; OCAK, E.; KAYGUSUZ, G.; GÖKCAN, M.K. Retroauricular Approach for Targeted Cochlear Therapy Experiments in Wistar Albino Rats. *Balkan Med Journal* 2017; 34: 200-205.

NERI, S.; SIGNORELLI, S.; PULVIRENTI, D.; MAUCERI, B.; CILIO, D.; BORDONARO, F. *et al.* Oxidative stress, nitric oxide, endothelial dysfunction and tinnitus. *Free Radical Research* 2006; 40(6): 615–618.

OLIVEIRA, P.F.; OLIVEIRA-BARRETO, A. C.; KLANK, F. A.; ROCHA, G. S.R.; PEDROSA, L. F. Implantação de um serviço de audiologia na oncologia hospitalar. In: SORDI, C.; NAHSAN, F.P.S.; PARANHOS, L.R. (Org.). *Coletâneas em Saúde*. 1ed. São José dos Pinhais: Editora Plena 2015, v.II, p. 88-98.

ONISHI, E.T. Abordagem médica do paciente com zumbido: a importância da avaliação otorrinolaringológica. In: *Zumbido: avaliação, diagnóstico e reabilitação*. São Paulo: Lovise; 2004. p. 37-44.

O'NEIL, M.F.; MOORE, N.A. Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol* 2003; 18(4): 239-54.

ONUSKO, E. Tympanometry. *Am. Fam. Phys.* 2004; 70(9): 1713–1720.

OOSTERLOO, B.C.; CROLL, P.H; BAATENBURG DE JONG, R.J.; IKRAM, M.K.; GOEDEGEBURE, A. Prevalence of Tinnitus in an Aging Population and Its Relation to Age and Hearing Loss. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 2021; 164(4) 859–868.

ÖZDEMİR, D.; ÖZGÜR, A.; KALKAN, Y.; TERZI, S.; TÜMKAYA, L.; YILMAZ, A. *et al.* The protective effects of whortleberry extract against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *J Pediatr* 2019; 85(1):55-62.

PACE, E.; LUO, H.; BOBIAN, M.; PANEKKAD, A.; ZHANG, X.; ZHANG, H. *et al.* Conditioned Behavioral Paradigm for Assessing Onset and Lasting Tinnitus in Rats. *PLoS ONE* 2016; 11(11): e0166346. doi: 10.1371/journal.pone.0166346.

PACE, E.; ZHANG, J. Noise-induced tinnitus using individualized gap detection analysis and its relationship with hyperacusis, anxiety, and spatial cognition. *PLOS ONE* 2013; 8(9): e75011. doi: 10.1371/journal.pone.0075011

PALL, M.L.; BEDIENT, S.A. The NO/ONOO – cycle as the etiological mechanism of tinnitus. *International Tinnitus Journal* 2007; 13(2):99-104.

PARHAM, K.; SOHAL, M.; PETREMANN, M.; ROMANET, C.; BROUSSY, A.; BA, C.T.V. *et al.* Noise-induced trauma produces a temporal pattern of change in blood levels of the outer hair cell biomarker prestin. *Hearing Research*. 2019; 371: 98-104.

PATTYN, T.; VAN DEN EEDE, F.; VANNESTE, S.; CASSIERS, L.; VELTMAN, D.; VAN DE HEYNING, P. *et al.* Tinnitus and anxiety disorders: a review, *Hearing Research* 2015; doi: 10.1016/j.heares.2015.08.014.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1985; 14: 149-167.

PETRIDOU, A.I.; ZAGORA, E.T.; PETRIDIS, P.; KORRES, G.S.; GAZOULI, M.; XENELIS, I. *et al.* The Effect of Antioxidant Supplementation in Patients with Tinnitus and Normal Hearing or Hearing Loss: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial. *Nutrients*. 2019; 11(3037):1-23.

PICCINELLI, AL.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, MC.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59(12): 6484-6891.

PIENKOWSKI, M. Loud Music and Leisure Noise Is a Common Cause of Chronic Hearing Loss, Tinnitus and Hyperacusis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021; 18:4236. doi.org/10.3390/ijerph18084236

PINHEIRO, K. S.; RIBEIRO, D. R.; ALVES, A. V.; PEREIRA-FILHO, R. N.; OLIVEIRA, C. R.; LIMA, S. O. *et al.* Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. *Acta Cirurgica Brasileira* 2014; 29 (2): 111-117.

PINTO, P.C.L.; MARCELOS, C.M.; MEZZASALMA, M.A.; OSTERNE, F.J.V.; DE MELO TAVARES DE LIMA, M.A.; NARDI, A.E. Tinnitus and its association with psychiatric disorders: systematic review 2014; *The Journal of Laryngology & Otology*; 128:660–664.

PINTO, W.B.V.R.; KO, G.M.; VALERO-LAPCHIK, V.B.; ARIZA, C.B.; PORCIONATTO, M. Teste de Labirinto em Cruz Elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *RESBCAL* 2012; 1(1): 102-120.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* 1978; 47: 379-391.

PRAYUENYONG, P.; KASBEKAR, A.V.; BAGULEY, D.M. Clinical Implications of Chloroquine and Hydroxychloroquine Ototoxicity for COVID-19 Treatment: A Mini-Review. *Frontiers in Public Health* 2020; 8:252. doi: 10.3389/fpubh.2020.00252.

PROCHÁZKOVÁ, K.; SEJNA, I.; SKUTIL, J.; HAHN, A. Ginkgo biloba extract EGb 761 ® versus pentoxifylline in chronic tinnitus: a randomized, double-blind clinical trial. *International Journal of Clinical Pharmacy* 2018. doi.org/10.1007/s11096-018-0654-4.

RADUNZ, C.L.; OKUYAMA, C.E.; BRANCO-BARREIRO, F.C.A.; PEREIRA, R.M.S.; DINIZ, S.N.; Clinical randomized trial study of hearing aids effectiveness in association with Ginkgo biloba extract (EGb 761) on tinnitus improvement. *Brazilian Journal Otorhinolaryngology* 2020; 86(6):734-742.

RADZIWON, K.E.; STOLZBERG, D.J.; URBAN, M.E.; BOWLER, R.A.; SALVI, R.J. Salicylate-induced hearing loss and gap detection deficits in rats. *Frontiers in Neurology* 2015; 6:31. doi: 10.3389/fneur.2015.00031.

RALLI, M.; LOBARINAS, E.; FETONI, A.R.; STOLZBERG, D.; PALUDETTI, G.; SALVI, R. Comparison of salicylate and quinine induced tinnitus in rats; development, time course and evaluation of audiological correlates. *Otol Neurotol* 2010; 31(5): 823–831.

RALLI, M.; TROIANI, D.; PODDA, M.V.; PACIELLO, F.; ERAMO, S.L.M; DE CORSO, E. *et al.* The effect of the NMDA channel blocker memantine on salicylate-induced tinnitus in rats. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014; 34:198-204.

REGUEIRA NETO, M.S.; TINTINO, S.R.; da SILVA, A.R.P.; COSTA, M.S.; BOLIGON, A.A.; MATIAS, E.F.F.; *et al.* Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening Original Research Article. *Food and Chemical Toxicology* 2017; 107:572-580.

RHEE, J.; LEE, D.; SUH, M.W.; LEE, J.H.; HONG, Y.; OH, S.H. *et al.* Prevalence, associated factors, and comorbidities of tinnitus in adolescents. *Plos One* 2020; 31;15(7): e0236723. doi: 10.1371/journal.pone.0236723.

RIBEIRO, D.R.; ALVES, A.V.F.; SANTOS, E.P.; PADILHA, F.F.; GOMES, M.Z.; RABELO, A.S. *et al.* Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2015, 117: 85–95.

RIGHI, A.A.; ALVES, T.R.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011; 91:2363-2370.

RISTIVOJEVIĆ, P.; TRIFKOVIĆ, J.; ANDRIĆ, F.; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D. Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Nat Prod Commun.* 2015; 10(11):1869-76.

ROBERTS, L.E.; EGGERMONT, J.J.; CASPARY, D.M.; SHORE, S.E.; MELCHER, J.R.; KALTENBACH, J.A. Ringing Ears: The Neuroscience of Tinnitus. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30(45):14972–14979.

ROCHA, G.S.R.; VARGAS, M.M.; GOMES, M.Z. Quality of life in individuals with tinnitus with and without hearing loss. *Revista Cefac* 2017; 19(6): 764-772.

ROSA, M.R.D.; ALMEIDA, A.A.F.; PIMENTA, F.; SILVA, C.G.; LIMA, M.A.R.; DINIZ, M.F.F.M. Zumbido e ansiedade: uma revisão da literatura. *Revista CEFAC* 2012, 4(14): 742-754.

ROYCE, J.R. On the construct validity of open field measures. *Psychological Bulletin* 1977; 84(6):1098–1106.

RUEL, J.; CHABBERT, C.; NOUVIAN, R.; BENDRIS, R.; EYBALIN, M.; LEGER, C.L. *et al.* Salicylate Enables Cochlear Arachidonic-Acid-Sensitive NMDA Receptor Responses. *Journal of Neuroscience* 2008; 28(29):7313-7323. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5335-07.2008

RUFATTO, L.C.; SANTOS, D.A.; MARINHO, F.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH, M.E.; MOURA, S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activit. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2017; 7(7): 591-598.

RÜTTIGER, L.; CIUIANI, J.; ZENNER, H.P.; KNIPPER, M. A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hearing Research* 2003; 180: 39-50.

SAKAMOTO, A.; KURODA, Y.; KANZAKI, S.; MATSUO, K. Dissection of the Auditory Bulla in Postnatal Mice: Isolation of the Middle Ear Bones and Histological Analysis. *J. Vis. Exp.* 2017; 119:e55054. doi:10.3791/55054.

SALIHOGU, M.; DOGRU, S.; CESMECI, E.; CALISKAN, H.; KURT, O.; KUC, Z. *et al.* Ototoxicity of boric acid powder in a rat animal model. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2018; 84(3): 332-337.

SALVI, R.; AUERBACH, B.D.; LAU, C.; CHEN, Y.; MANOHAR, S.; LIU, X. *et al.* Functional Neuroanatomy of Salicylate- and Noise-Induced Tinnitus and Hyperacusis. *Curr Top Behav Neurosci* 2021; doi: 10.1007/7854_2020_156.

SANCHEZ, T.G.; FERRARI, G.M.S. O que é zumbido. In: SAMELLI, A.G. Zumbido: avaliação, diagnóstico e reabilitação. São Paulo: Lovise; 2004. p. 17-22.

SANTOS, P.; SILVA, L.E.C.M.; LEÃO, R.M. Specific immediate early gene expression induced by high doses of salicylate in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Braz J Otorhinolaryngology* 2017; 83(2):155-161.

SAVASTANO, M.; BRESCIA, G.; MARIONI, G. Antioxidant Therapy in Idiopathic Tinnitus: Preliminary Outcomes. *Archives of Medical Research* 2007; 38:456e459.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C., Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1998; 59(4):807–811.

SCHMITZ, H.M.; JOHNSON, S.B.; SANTI, P.A. Kanamycin-Furosemide Ototoxicity in the Mouse Cochlea: A 3-Dimensional Analysis. *Otolaryngology -- Head and Neck Surgery* 2014; 150: 666-672. DOI: 10.1177/0194599813519071

SEKIYA, T.; MATSUMOTO, M.; KOJIMA, K.; ONO, K.; KIKKAWA, Y.S.; KADA, S. *et al.* Mechanical stress-induced reactive gliosis in the auditory nerve and cochlear nucleus. *J Neurosurg* 2011; 114(2): 414-25.

SFORCIN, JM.; FERNANDES JR, A.; LOPES, CA.; BANKOVA, V.; FUNARI, SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (1-2), p.243-249, 2000.

SHEPPARD, A.M.; CHEN, G.; SALVI, R. Potassium ion channel openers, Maxipost and Retigabine, protect against peripheral salicylate ototoxicity in rats. *Hearing Research* 2015; 327:1-8. doi.org/10.1016/j.heares.2015.04.007

SHEPPARD, A.; HAYES, S.H.; CHEN, G.D.; RALLI, M.; SALVI, R. Review of salicylate-induced hearing loss, neurotoxicity, tinnitus and neuropathophysiology. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014; 34(2):79-93.

SHIH, C.P.; KUO, C.Y.; LIN, Y.Y.; LIN, Y.C.; CHEN, H.K.; WANG, H. *et al.* Inhibition of Cochlear HMGB1 Expression Attenuates Oxidative Stress and Inflammation in an Experimental Murine Model of Noise-Induced Hearing Loss. *Cells* 2021; 10:810. doi.org/10.3390/cells10040810.

SILVA, JFM.; SOUZA, MC.; MATTA, SR.; ANDRADE, MR.; VIDAL, FVN. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99 (3), p.431–435, 2006.

SOUZA, L.; PIZA, M.R.T.; ALVARENGA, K.F.; CÓSER, P.L. Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações clínicas. 3 ed. São Paulo: Tecmedd, 2008.

SOYALIÇ, H.; GEVREK, F.; KOÇ, S.; AVCU, M.; METIN, M.; ALADAĞ, I. Intraperitoneal curcumin and vitamin E combination for the treatment of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Int. Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2016; 89:173-178.

STOHLER, N.A.; REINAU, D.; JICK, S.S.; BODMER, D.; MEIER, C.R. A study on the epidemiology of tinnitus in the United Kingdom. *Clinical Epidemiology* 2020; 11: 855–871.

STOLZBERG, D.; CHEN, G.; ALLMAN, B.L.; SALVI, R.J. Salicylate-induced peripheral auditory changes and tonotopic reorganization of auditory cortex. *Neuroscience* 2011; 28-180:157–164.

STOLZBERG, D.; SALVI, R.J.; ALLMAN, B.L. Salicylate toxicity model of tinnitus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 2012; 6(28):1-12. doi: 10.3389/fnsys.2012.00028.

TIAN, Z.; LIU, S.; WANG, Y.; LI, X.; ZHENG, L.; ZHAO, M. Neuroprotective effects of formononetin against NMDA-induced apoptosis in cortical neurons. *Phytother Res* 2013; 27(12):1770-5. doi:10.1002/ptr.4928.

TREVIÑO-GONZÁLEZ, J.L.; GONZÁLEZ, M.J.V.; BARRERA, E.V.; ELIZONDO, F.B.; RAMÍREZ, N.G.J. Tinnitus, an updated review: *Am J Rhin and Otol*. 2020; 2(1): 01-09.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, MC.; MIORIN, PL. *et al.* Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2006; 3(2): 249-254.

TZIRIDIS, K.; KORN, S.; AHLF, S.; SCHULZE, H. Protective Effects of Ginkgo Biloba Extract EGb 761 against Noise Trauma-Induced Hearing Loss and Tinnitus Development. *Neural Plasticity* 2014; ID 427298, 27p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/427298>.

UDE, C.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WURGLICS, M. Ginkgo biloba Extracts: A Review of the Pharmacokinetics of the Active Ingredients *Clin Pharmacokinet* 2013; DOI 10.1007/s40262-013-0074-5

VINAGRE, L.M.; GUARIENTO, M.E. Tratamento clínico de zumbido primário em adultos e idosos: revisão sistemática. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2018; 16(4):249-54.

WALLHAUSSER-FRANKE, E.; MAHLKE, C.; OLIVA, R.; BRAUN, S.; WENZ, G.; LANGNER, G. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp Brain Res* 2003; 153: 649–654.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. *PSYCHOL BULL* 1976; 83(3):482-504.

WANG, K.; TANG, D.; MA, J.; SUN, S. Auditory Neural Plasticity in Tinnitus Mechanisms and Management. *Hindawi Neural Plasticity* 2020; v. 2020, ID 7438461, 17 p. <https://doi.org/10.1155/2020/7438461>

- WANG, M.; SONG, Y.; LIU, J.; DU, Y.; XIONG, S.; FAN, X. *et al.* Role of the caudate-putamen nucleus in sensory gating in induced tinnitus in rats. *Neural Regen Res* 2021; 16(11):2250-2256. 10.4103/1673-5374.310692.
- WANG, X.; GUAN, S.; LIU, A.; YUE, J.; HU, L.; ZHANG, K. *et al.* Anxiolytic effects of Formononetin in an inflammatory pain mouse model. *Mol Brain* 2019; 8;12(1):36. doi: 10.1186/s13041-019-0453-4.
- WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1967; 63(3): 500-504.
- WINNE, J.; BOERNER, B.C.; MALFATTI, T.M.; BRISA, E.; DOERL, J.; NOGUEIRA, I. *et al.* Anxiety-like behavior induced by salicylate depends on age and can be prevented by a single dose of 5-MeO-DMT. *Exp Neurol* 2020; 326:113175. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113175.
- XIONG, M.; HE, Q.; LAI, H.; HUANG, W.; WANG, L.; YANG, C. Radix astragali injection enhances recovery from sudden deafness. *Am J Otolaryngol.* 2012; 33(5):523-527b.
- XIONG, M.; HE, Q.; LAI, H.; WANG, J. Astragaloside IV inhibits apoptotic cell death in the guinea pig cochlea exposed to impulse noise. *Am J Otolaryngol.* 2012; 132(5):467-74a.
- XIONG, M.; ZHU, Y.; LAI, H.; FU, X.; DENG, W.; YANG, C. *et al.* Radix astragali inhibits the down-regulation of connexin 26 in the stria vascularis of the guinea pig cochlea after acoustic trauma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2015; 272(9):2153–2160.
- XIONG, S.; SONG, Y.; LIU, J.; DU, Y.; DING, Y.; WEI, H. *et al.* Neuroprotective effects of MK-801 on auditory cortex in salicylate-induced tinnitus: Involvement of neural activity, glutamate and ascorbate. *Hear Res* 2019; 375:44-52. 10.1016/j.heares.2019.01.021.
- YANAGAWA, Y.; TAKASU, K.; OSANAI, H.; TATENO, T. Salicylate-induced frequency-map reorganization in four subfields of the mouse auditory cortex. *Hearing Research* 2017; 351:98-115. doi.org/10.1016/j.heares.2017.06.003.
- YANG, E.; PARK, G.H.; SONG, K. Neuroprotective effects of liquiritigenin isolated from licorice roots on glutamate-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells. *Neurotoxicology* 2013; 39:114-23. doi:10.1016/j.neuro.2013.08.012.
- YANG, T.H.; YOUNG, Y.H.; LIU, S.H. EGb 761 (Ginkgo biloba) protects cochlear hair cells against ototoxicity induced by gentamicin via reducing reactive oxygen species and nitric oxide-related apoptosis *Journal of Nutritional Biochemistry* 2011; 22:886–894.
- ZENNER, H.; DELB, W.; KRONER-HERWIG, B.; JAGER, B.; PEROZ, I.; HESSE, G. *et al.* A multidisciplinary systematic review of the treatment for chronic idiopathic tinnitus. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2017; 274: 2079–2091.
- ZHANG, J.; LUO, H.; PACE, E.; LI, L.; LIU, B. Psychophysical and neural correlates of noised-induced tinnitus in animals: Intra- and inter-auditory and non-auditory brain structure studies. *Hearing Research* 2016; 334:7-19.
- ZHANG, W.; PENG, Z.; YU, S.; SONG, Q.; QU, T.; LIU, K.; GONG, S. Exposure to Sodium Salicylate Disrupts VGLUT3 Expression in Cochlear Inner Hair Cells and Contributes to Tinnitus. *Physiol. Res.* 2020; 69: 181-190.

ZHANG, Y.; YU, Y.; XU, M.; HAN, F.; TIAN, C.; KIM, S. *et al.* Pathological Features in the LmnaDhe/_ Mutant Mouse Provide a Novel Model of Human Otitis Media and Laminopathies. *The American Journal of Pathology* 2012; 181(3):761-774.

ZHENG, Q.Y.; TONG, Y.I.; ALAGRAMAM, K.N.; YU, H. Tympanometry assessment of 61 inbred strains of mice. *Hearing Research* 2007; 231: 23–31.

ZHENG, Y.; SEUNG LEE, H.; SMITH, P.F.; DARLINGTON, C.L. Neuronal nitric oxide synthase expression in the cochlear nucleus in a salicylate model of tinnitus. *Brain Res.* 2006; 1123(1):201-6.

ZHENG, Y.; VAGAL, S.; ZHU, X.; WAELE, C.; SMITH, P.F. Guangji Wangd, Ming Zhangb, Cynthia L. Darlingtona The effects of the Chinese herbal medicine EMF01 on salicylate-induced tinnitus in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 128:545–548.

ZIAI, K.; MOSHTAGHI, O.; MAHBOUBI, H.; DJALILIAN, H.R. Tinnitus Patients Suffering from Anxiety and Depression: A Review. *International Tinnitus Journal* 2017; 21(1):68-73.

ZUGAIB, J.; CEBALLOS, C.C.; LEÃO, R.M. High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Hear Res* 2016; 332:188-198. doi: 10.1016/j.heares.2015.10.008.

ANEXO

ANEXO 1 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre o zumbido induzido por salicilato de sódio em roedores", registrada com o nº 030917R, sob a responsabilidade de Margarete Zanardo Gomes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 30/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	01/07/2018 a 16/10/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de Animais	48
Peso/idade	200 a 250 g / 2 – 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério da UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof.ª Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Aracaju, 30 de maio de 2018

Maria Júlia Nardelli
Coordenadora Substitua da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B.FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79)3218 2206
FAX: (79) 3218 21 00