

Gli effetti del salicilato sulla funzione uditiva: neurotossicità ed acufene

Ralli M, Hayes SH, Chen GD, Salvi R, Sheppard A

Riassunto

Il salicilato, precursore dell'aspirina, è un farmaco antipiretico, analgesico ed anti-infiammatorio molto diffuso nella pratica clinica. Gli effetti del salicilato sulla funzione uditiva sono noti ed includono, quando somministrato ad alti dosaggi, acufene ed ipoacusia. In periferia, la somministrazione acuta di salicilato induce una riduzione d'ampiezza dei prodotti di distorsione delle otoemissioni acustiche (DPOAE) e del potenziale d'azione composto (CAP), prevalentemente per le basse (<10 kHz) e per le alte (>20 kHz) frequenze; è interessante come questa alterazione corrisponda alla tonalità dell'acufene indotto sperimentalmente nell'animale, che varia tra i 12 e i 16 kHz. La somministrazione cronica induce invece un aumento transitorio dell'ampiezza dei DPOAE ed una up-regulation dell'mRNA e dell'espressione proteica della prestina. In vitro la tossicità del sodio salicilato si evidenzia prevalentemente a livello dei neuroni del ganglio spirale inducendo, a dispetto delle ben note proprietà antiossidanti, un rilascio paradossale di radicale superossido che avvia la catena apoptotica. A livello centrale, il salicilato ha la capacità di alterare la trasmissione GABA e serotonina-mediata inducendo iperattività in specifiche popolazioni neuronali. Molto interessanti sono gli effetti a livello della corteccia uditiva e dell'amigdala laterale dove è stata documentata, in seguito alla somministrazione sperimentale di salicilato, una variazione delle frequenze caratteristiche neuronali con una conseguente alterazione della tonotopia fisiologica, specialmente per le frequenze centrali (10-20 kHz). Nell'uomo gli effetti ototossici del salicilato, oltre ad ipoacusia transitoria ed acufene, includono una diminuita discriminazione verbale e difficoltà nell'integrazione temporale.

Introduzione

Il principio attivo contenuto nell'aspirina, il salicilato, è un farmaco antipiretico, analgesico e anti-infiammatorio comunemente utilizzato nella pratica clinica. Tuttavia, è ampiamente noto che il consumo ad alte dosi (6-8 gr/die) (1) può indurre ipoacusia e acufene (2-4). Originariamente si pensava che gli effetti del salicilato sul sistema uditivo fossero temporanei, ma studi più recenti mostrano che dosi elevate e prolungate di salicilato di sodio (SS) possono causare danni duraturi nell'orecchio interno, sopprimendo l'output neuronale del sistema periferico (5). Inoltre, nonostante le proprietà antiossidanti del salicilato, elevate dosi in vitro causano un effetto paradossale di up-regulation del radicale superossido, portando ad apoptosi dei neuroni del ganglio spirale del Corti (SGN) (6).

I livelli ematici di salicilato libero hanno un'elevata correlazione con la severità dell'ipoacusia indotta (2,7), tuttavia il livello di salicilato nel siero è in qualche maniera meno predittivo (8,9). Dato che elevate dosi di salicilato possono indurre in modo prevedibile ipoacusia e acufene, la molecola è comunemente utilizzata per studiare i suoi

effetti comportamentali, anatomici, fisiologici e percettivi sul sistema uditivo (10,11). Perifericamente, il salicilato influenza la sensibilità uditiva delle basse (<10 kHz) ed alte (>20 kHz) frequenze più delle frequenze medie (10-20 kHz) (5). Dopo la somministrazione di elevate dosi di salicilato, è stata documentata una variazione della frequenza caratteristica neuronale (FC) dei neuroni della corteccia uditiva (AC) risultando in una sovra rappresentazione per le frequenze medie (12). Inoltre, è stata registrata un'iperattività di questi neuroni a livelli elevati di stimolazione uditiva (13-15). Queste alterazioni a livello della corteccia potrebbero essere inoltre facilitate dagli effetti inibitori del salicilato sull'acido γ -amminobutirrico (GABA) e sulla serotonina, importanti neurotrasmettitori inibitori centrali (16-18). Poiché è noto come il salicilato modifichi la neurotrasmissione in tutto il SNC, anche le strutture uditive "non classiche" che rispondono agli stimoli sonori, come l'amigdala, hanno mostrato iperattività neuronale ed uno shift della regolazione delle FC dopo la somministrazione sistemica di salicilato (19).

Nonostante lo shift della soglia uditiva e l'insorgenza di acufene siano indotti in modo prevedibile dal salicilato nei modelli animali, negli esseri umani le alterazioni percettive oggettive e soggettive sembrano essere più variabili (20-22). Come finora brevemente descritto, negli ultimi anni è aumentata in maniera significativa la conoscenza relativa agli effetti del salicilato sul sistema uditivo periferico e centrale; in questa review evidenzieremo i più importanti effetti di questo farmaco a livello delle strutture uditive, partendo da una revisione della letteratura fino alle ultime evidenze raccolte presso il nostro laboratorio.

SALICILATO E CELLULE CILIATE ESTERNE

Il salicilato condiziona la risposta di elettromotilità della CCE spiazzando il cloruro dai siti di legame anionici sulla prestina, sopprimendo quindi le proprietà di amplificazione della coclea (23,24). La proteina motrice prestina, che si trova sulla parete laterale della CCE, cambia forma in risposta alle fluttuazioni nel voltaggio che si verificano attraverso la membrana della cellula. La depolarizzazione della CCE causa un accorciamento lungo l'asse della cellula, mentre

l'iperpolarizzazione ne causa l'allungamento (25). I movimenti assiali indotti dalla depolarizzazione e dall'iperpolarizzazione nelle CCE, associati ai movimenti della membrana basale delle stesse cellule indotti dalle onde sonore, generano l'amplificazione, dipendente dalla frequenza, della risposta agli stimoli uditivi (26).

L'analisi della motilità delle CCE mediante i prodotti di distorsione delle otoemissioni acustiche (DPOAE) ha dimostrato una riduzione dell'intensità del prodotto durante il trattamento sistemico con salicilato in acuto. La Figura 1 mostra la risposta media di input/output (I/O) nel DPOAE in 6 ratti Sprague/Dawley: prima del trattamento con 300 mg/kg di sodio salicilato i DPOAE avevano normale intensità, mentre 1 e 2 ore dopo la somministrazione del farmaco è stata registrata una notevole riduzione di intensità per le basse frequenze (2f1-f2 <11 kHz) e per le alte frequenze (2f1-f2 11 -20 kHz) (12). Se da un lato il salicilato ha causato una riduzione significativa nei DPOAE indicante ipoacusia sensoriale, i modelli comportamentali animali hanno indicato che questa dose induce anche acufene (27-29) con una frequenza compresa tra i 12 e i 16 kHz.

Se nel trattamento acuto con salicilato l'alterazione della prestina è transitoria e induce le alterazioni di elettromotilità delle CCE responsabili dell'ipoacusia e dell'acufene, anche il trattamento

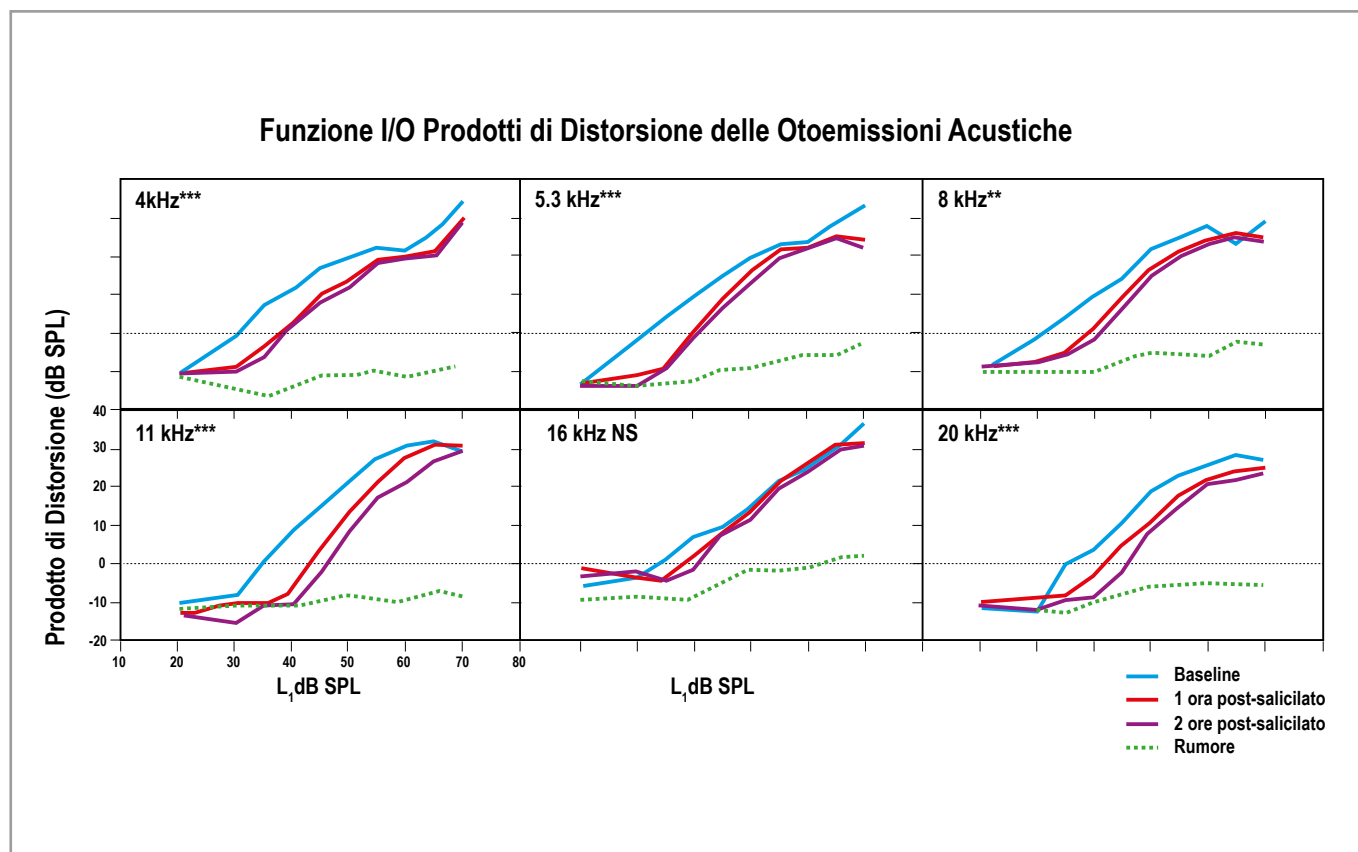


Figura 1. DPOAE - funzionalità input/output. Schema delle ampiezze medie del DPOAE in funzione dell'intensità L1, misurate prima del trattamento con salicilato (300 mg/kg i.p.), 1 h dopo il trattamento e 2 h dopo trattamento. La somministrazione sistemica acuta di salicilato ha ridotto significativamente le ampiezze dei DPOAE alle basse (4, 5.3, 8, e 11 kHz) e alte frequenze (20 kHz) ma non alle frequenze medie (16 kHz) (** p=0.01; *** p=0.001; ns=non significativo).

DPOAE: prodotti di distorsione delle otoemissioni acustiche.

cronico influenza la prestina, ma in modo differente. Difatti, in seguito a somministrazione prolungata di salicilato, è stato registrato un incremento delle ampiezze dei DPOAE ed una up-regulation dell'mRNA della prestina e, quindi, della sua espressione a livello delle CCE (30). Nel nostro esperimento, gli animali sono stati trattati cronicamente con 300 mg/kg di salicilato in due periodi di 4 giorni consecutivi, con un periodo di recupero di due giorni, per un totale di 10 giorni. Durante il trattamento, le ampiezze del DPOAE erano significativamente ridotte; tuttavia, ogni periodo di trattamento era seguito da un effetto rebound significativo delle ampiezze del DPOAE rispetto ai valori pre-trattamento (5). Non è stata rilevata alcuna variazione nelle ampiezze del DPOAE dopo trattamento di lunga durata con salicilato a livelli moderati (200 mg/kg/die, 5 giorni alla settimana, per 3 settimane) (5).

Nei nostri esperimenti, l'espressione di prestina-mRNA è aumentata progressivamente in seguito alle somministrazioni giornaliere; i western blot hanno indicato un aumento nella proteina della prestina (31). Quattro settimane dopo la fine del trattamento con SS i livelli di mRNA della prestina sono ritornati alla normalità (31). Questi risultati indicano pertanto che in seguito a somministrazione cronica di dosi elevate di salicilato, la funzione di elettromotilità delle CCE si innalza, risultando in una maggiore amplificazione cocleare. Qualcuno ha ipotizzato che l'acufene possa svilupparsi in seguito ad uno squilibrio tra l'attività di cellule ciliate interne (CCI) ed esterne (CCE) (32); la up-regulation nella prestina osservata potrebbe causare un tale squilibrio e così essere responsabile dell'insorgenza dell'acufene. Infatti, basse dosi terapeutiche croniche di aspirina possono causare solo acufene senza ipoacusia (2,33).

Presi insieme, questi risultati indicano che la somministrazione cronica di elevate dosi di salicilato può avere effetti a lungo termine sulle cellule sensoriali cocleari, contribuendo all'ipoacusia sensoriale, all'acufene e verosimilmente a mutamenti plastici del sistema uditivo centrale.

Sono stati studiati anche gli effetti di dosi elevate di sodio salicilato sul potenziale microfonico cocleare (MC) e sul potenziale di sommazione (PS) dopo applicazione sistemica o locale. Il MC, generato prevalentemente dalle CCE dal potenziale endococleare +80 mV, riflette ampiamente il flusso di ioni potassio attraverso le stereociglia poste sul polo apicale delle CCE in risposta alla stimolazione acustica (36). Il PS, un potenziale evocato da stimoli acustici, è generato prevalentemente dalle CCI con un minor contributo delle CCE (37). Il MC, in risposta a una scarica tonale da 10 kHz, non è stato molto condizionato dalla perfusione cocleare con salicilato (38); tuttavia altri studi hanno riscontrato un aumento nella risposta del MC ad una scarica di 1 kHz (39). Non è stato osservato nessun cambiamento significativo del PS a seguito di perfusione cocleare nella cavia. Questi dati funzionali suggeriscono che la perfusione intracocleare di SS ha poco effetto sulle cellule ciliate.

SALICILATO E CELLULE CILIATE INTERNE

Il salicilato è noto per la sua azione di depressione del potenziale d'azione composto (CAP) cocleare (5,12), che corrisponde al primo

picco negativo (N1) della risposta elettrica generata dalla finestra ovale della coclea, in risposta a un click o una scarica tonale; il CAP riflette la risposta simultanea delle fibre nervose uditive di tipo I direttamente connesse alle cellule ciliate interne.

La Figura 2 mostra i mutamenti che si verificano nella funzione del CAP I/O a diverse frequenze (4, 12, 16, e 30 kHz) in ratti trattati con salicilato (300 mg/kg, i.p) o dose equivalente di salina due ore dopo la somministrazione. L'influenza del salicilato sull'elettromotilità delle CCE induce una riduzione significativa della soglia (20-30 dB) ed una riduzione d'ampiezza del CAP. Tali alterazioni si verificano prevalentemente per le frequenze <4 kHz e >30 kHz, indicando che l'amplificazione cocleare è ancora ampiamente funzionante per le frequenze medie. Questi risultati sono in accordo con i dati DPOAE che indicano una riduzione di alcune frequenze nell'amplificazione cocleare. Le ampiezze del CAP sono apparse ridotte in maniera significativa a livelli elevati di stimolazione, (ad es. ampiezza diminuita da ~90 µV a ~20 µV ad 80 dB SPL). Questo potrebbe indicare che il salicilato ha un effetto acuto sulle cellule ciliate interne e/o a livello del ganglio spirale (SGN) (6). A livello del potenziale di sommazione, un potenziale evocato da stimolazione sonora generato prevalentemente dalle CCI insieme a un più piccolo contributo delle CCE, non sono state registrate alterazioni in seguito a perfusione cocleare con salicilato (33).

Nel trattamento prolungato con dosi elevate di salicilato sono state osservate alterazioni strutturali a livello del ganglio spirale, a differenza delle CCE che invece non hanno evidenziato tali alterazioni (6,34,35). In un nostro esperimento, abbiamo somministrato 200 mg/kg (i.p.) di salicilato per 5 giorni alla settimana per 3 settimane consecutive a 6 ratti e ad un gruppo di controllo (soluzione salina).

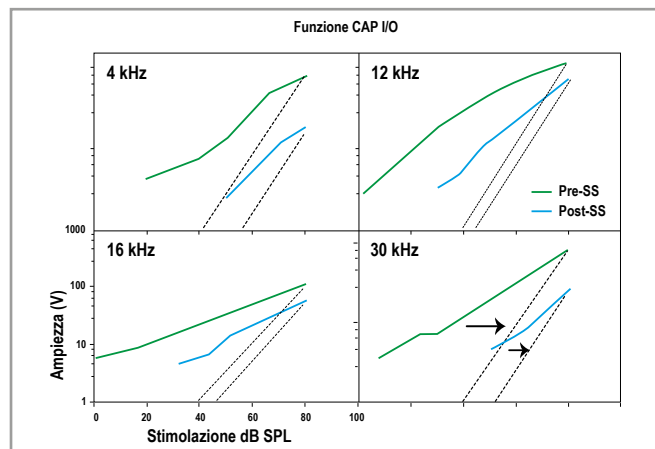


Figura 2. CAP I/O prima del trattamento con salicilato (linea blu) e 2 h post-trattamento (linea rossa). La distanza tra le linee tratteggiate e le funzioni del CAP I/O rappresenta l'amplificazione residua dalle CCE. A frequenze basse (4 kHz) ed elevate (40 kHz) la funzione del CAP I/O diventa più lineare rispetto alle frequenze medie (12 e 16 kHz). Lo spostamento della soglia è maggiore per le frequenze gravi ed acute (SPL ~30 dB) rispetto alle frequenze medie (SPL ~20 dB). Questi dati dimostrano che l'ipoacusia indotta da salicilato influenza le proprietà di amplificazione delle CCE con modalità frequenza-dipendente, coerentemente con le alterazioni viste nei prodotti di distorsione.

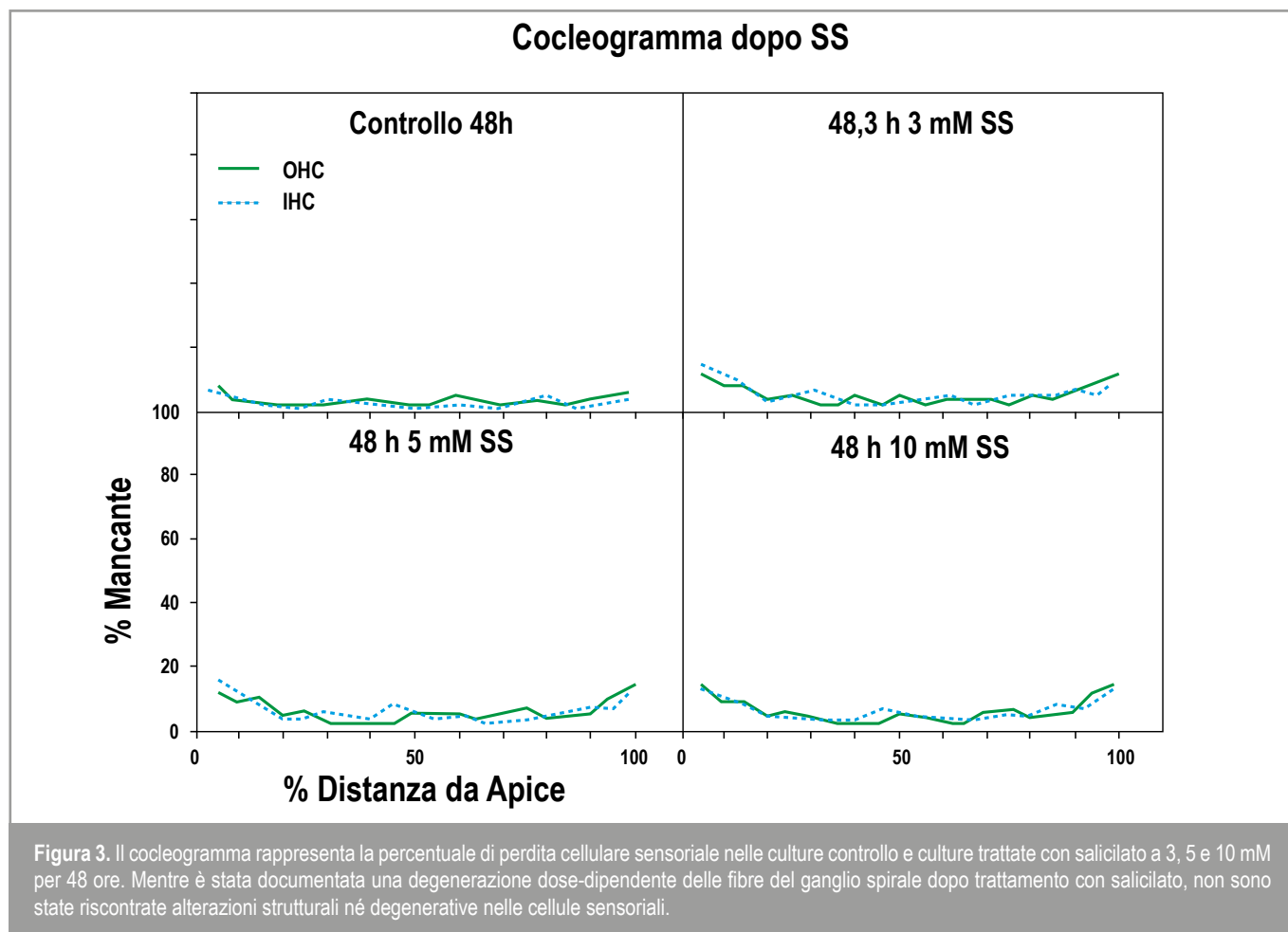
Le funzioni del CAP I/O sono state misurate 4 settimane dopo la fine del trattamento. Nel gruppo trattato con sodio salicilato è stata evidenziata una lieve ma significativa riduzione nelle ampiezze del CAP, a confronto con il gruppo controllo. Le funzioni del CAP I/O erano ancora non lineari in entrambi i gruppi indicando una normale funzione delle CCE. Questi risultati sono pertanto indicativi di un danno funzionale e strutturale al ganglio spirale, in accordo con i dati ABR che mostrano una riduzione delle ampiezze prevalentemente per le frequenze basse ed elevate, a livelli elevati di stimolazione, dopo trattamento cronico con salicilato (5).

SALICILATO E GANGLIO SPIRALE DEL CORTI

Un recente studio ha dimostrato che dosi elevate di SS possono danneggiare il SGN senza creare un danno concomitante alle cellule cocleari sensoriali (34,35). Per valutare gli effetti del salicilato sul SGN, sono state trattate culture organotipiche postnatali al giorno 3 con SS per 48 ore. Le cellule ciliari sono state marcate con falloidina coniugata con il fluorocromo Alexa-488 e le fibre nervose uditive sono state immunomarcate con un anticorpo monoclonale per la β -tubulina di classe III.

Il trattamento con SS non ha indotto perdita di cellule ciliate anche alla dose più alta di 10 mM; tuttavia le fibre periferiche, sono diminuite nel numero e hanno mostrato molte vescicole e rotture direttamente proporzionali all'aumento della dose di SS (34).

In un nostro precedente lavoro (6) abbiamo documentato una degenerazione dose dipendente delle fibre periferiche del SGN dopo essere state esposte per 48 h al salicilato a 3 mM, 5 mM e 10 mM. Il cocleogramma medio, rappresentato nella Figura 3, mostra le percentuali delle CCE e CCI mancanti nelle colture di controllo e in quelle trattate con salicilato a 3, 5 o 10 mM. Questi risultati indicano che anche la dose più elevata di salicilato non reca danno strutturale alle cellule ciliate. Inoltre, recenti studi in vivo indicano che elevate dosi di salicilato possono portare alla degenerazione del SGN mediante apoptosi caspasi-mediata (40). Paradossalmente, anche se il salicilato è un potente antiossidante con proprietà neuro- e oto-protettive (41,42), la somministrazione ad alte dosi è in grado di indurre un brusco rialzo del radicale superossido che è altamente tossico per il SGN ma non per le vicine cellule sensoriali e di supporto.



SALICILATO E NERVO ACUSTICO

In letteratura sono presenti risultati variabili circa gli effetti del salicilato sul nervo acustico, differenti a seconda del dosaggio, della via di somministrazione o delle differenze di specie. Nei gatti, è stato riscontrato un aumento significativo delle scariche spontanee del nervo in seguito ad una dose estremamente elevata di salicilato (400 mg/kg, i.v.) (43).

Al contrario nei gerbilli è stata vista una lieve ma significativa riduzione della frequenza di scarica del nervo acustico con la somministrazione di una dose moderata di salicilato (200 mg/kg i.p.) per i neuroni con frequenza caratteristica (FC) bassa, ma non in quelli con FC alta (44). Peraltro, confronti crociati fra queste specie non sono affidabili, a causa dell'incapacità dei gatti di metabolizzare il salicilato in maniera efficace (45,46).

Sono stati valutati gli effetti del trattamento cronico con salicilato sull'attività nervosa uditiva spontanea (47). Nelle cavie è stato registrato lo spettro medio dell'attività elettrofisiologica neurococleare (Average Spectrum of Electrophysiological Cochleoneural Activity ASECA) della finestra ovale, una misura dell'attività del nervo uditivo durante un periodo di alcune settimane di somministrazione di salicilato (200 mg/kg/die i.m.).

L'ASECA è diminuito nelle ore successive alla somministrazione di salicilato; tuttavia, dopo alcuni giorni questa soppressione è stata attenuata e si sono ripristinati i livelli normali. Durante le settimane successive l'ASECA è aumentato progressivamente; inoltre, dopo la fine del trattamento, l'ASECA si è invertito ed è progressivamente diminuito fino ai valori misurati inizialmente (47). L'aumento dell'attività spontanea del nervo uditivo, osservato in questi studi, è stato indicato come il corrispettivo neuronale dell'acufene (47,48); tuttavia la diminuzione osservata in altri studi solleva dubbi su questo modello.

Considerati complessivamente, i risultati indicano che l'effetto del salicilato sul sistema uditivo periferico risulta principalmente in una riduzione della sensibilità uditiva (spostamento soglia) causata dalla soppressione frequenza-dipendente dell'elettromotilità delle CCE. Precedentemente si era pensato che l'influenza del salicilato sulla sensibilità uditiva fosse temporanea; ma dati recenti suggeriscono che il trattamento prolungato con dosi elevate di salicilato possa condurre a disfunzioni durature delle CCE (5) e degenerazione del SGN (6,34). Mentre alcuni studi hanno riportato un aumento dell'attività spontanea nel nervo uditivo dopo trattamento con SS, altri hanno riscontrato una diminuzione o nessun cambiamento (44). Di conseguenza, resta aperta la questione su quale ruolo giocano le scariche spontanee del nervo uditivo nella percezione dell'acufene, dal momento che un danno cocleare severo abolisce ampiamente l'attività spontanea (49).

SALICILATO E COLLICULO INFERIORE

Il collicolo inferiore (CI) è stata una delle prime regioni cerebrali utilizzate per indagare gli effetti del salicilato sul sistema nervoso centrale. Il principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC, l'acido γ -amminobutirrico (GABA), gioca un ruolo importante nella funzione e nella regolazione dell'attività del collicolo inferiore (16,50-52).

Il salicilato ha un importante effetto inibitorio sull'attività GABAergica; di qui il suo ruolo nell'attività del collicolo inferiore (18).

Le risposte elettrofisiologiche nel CI non mostrano iperattività evocata dal suono dopo somministrazione di salicilato, diversamente dal sistema uditivo centrale dove sono stati osservati livelli più elevati (13). Tuttavia, poiché le ampiezze della risposta del CI sono quasi normali a livelli sopra soglia, mentre le risposte del CAP sono ridotte, questi risultati implicano che a valle del nervo uditivo si verifica una sorta di guadagno compensatorio per riportare le ampiezze del CI ai loro livelli normali.

Oltretutto, le registrazioni elettrofisiologiche hanno segnalato negli animali da esperimento un aumento dell'attività spontanea nel nucleo esterno del CI (eCI) dopo somministrazione di salicilato (53). Al contrario, durante la registrazione nel nucleo centrale del CI (CIc) nei gatti anestetizzati, la somministrazione acuta di salicilato ha ridotto l'attività spontanea nei neuroni a basse frequenze (54), analogamente a quanto riportato per il nervo uditivo del gerbillo (44). In conclusione, differenti regioni del CI sembrano rispondere in maniera diversa a dosi elevate di SS.

SALICILATO E CORPO GENICOLATO MEDIALE

Il Corpo Genicolato Mediale (CGM) del talamo gioca un ruolo essenziale nelle vie acustiche centrali, e perciò è stato considerato un possibile contributore alla percezione dell'acufene (55). Le registrazioni extracellulari *in vitro* hanno indicato che il salicilato può alterare drasticamente il tasso di attivazione spontanea dei neuroni nel CGM, che è stato osservato in approssimativamente il 52.4% dei neuroni dopo trattamento con salicilato (56). Al fine di valutare ulteriormente gli effetti del salicilato nel CGM, abbiamo misurato il Local Field Potential (LFP) pre- e post-salicilato (300 mg/kg, i.p.).

La Figura 4 mostra una diminuzione del LFP a bassi livelli di stimolo, ma rapidamente aumentate ad alte intensità. Le registrazioni preliminari provenienti dai raggruppamenti multiunità nel CGM hanno dimostrato anche un generale aumento nella frequenza di scarica post-trattamento con SS. Poiché il CGM fornisce input eccitatori alla corteccia uditiva primaria (A1), è probabile che i cambiamenti nel CGM influenzino significativamente l'attività nell'A1.

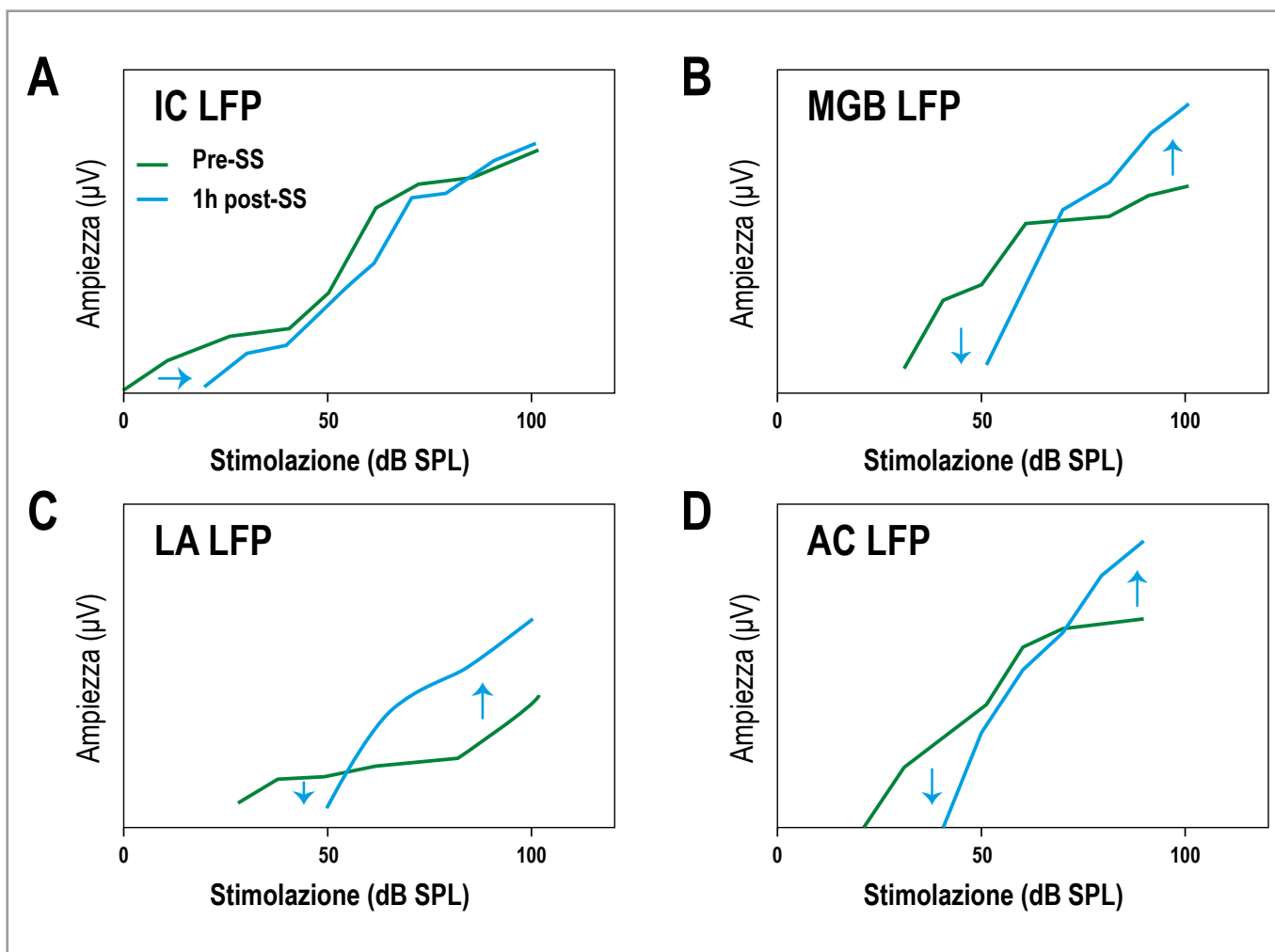


Figura 4. (A) Effetti del salicilato sistemico sui LFP del CI, MGB, AL e AC. (A) LFP nel CI prima del trattamento sistemico con SS e 2 h post-trattamento con SS (250 mg/kg i.p.). Il salicilato non ha modificato le ampiezze registrate dal CI; tuttavia si è verificato uno spostamento di soglia SPL di circa 20 dB. È probabile che lo spostamento di soglia sia dovuto agli effetti soppressivi del salicilato sull'amplificazione dell'elettromotilità delle CCE. (B) LFP nel CGM prima della somministrazione sistemica del SS e 2 h post-somministrazione del SS (300 mg/kg i.p.). Si osserva uno spostamento di soglia di SPL di circa 20 dB. A bassi livelli di stimolazione si sono ridotte le ampiezze dei LFP. Probabilmente questo potrebbe essere attribuito agli effetti soppressivi del SS nel sistema periferico. A livelli elevati di stimolazione le ampiezze dei LFP sono aumentate. Probabilmente questo potrebbe essere attribuito agli effetti inibitori del salicilato sull'attività GABAergica. (C) LFP nella AL prima della somministrazione sistemica di SS e 2 h post-somministrazione di SS (300 mg/kg i.p.). I risultati sono stati simili a quelli osservati nel CGM, con lo spostamento della soglia SPL di circa 20 dB, con riduzione delle ampiezze dei LFP a bassi livelli di stimolazione, e aumento delle ampiezze dei LFP ad alta stimolazione. (D) LFP nella AC prima della somministrazione sistemica di SS e 3 h post-somministrazione sistemica di SS (300 mg/kg i.p.). Nuovamente, i risultati sono simili a quelli osservati per CGM e AL. LFP: potenziali di campo locali; CGM: corpo genicolato mediale; AL: amigdala laterale; AC: corteccia uditiva. SPL: livello di pressione sonora. CCE: cellule ciliate esterne.

SALICILATO E CORTECCIA UDITIVA

In base a quanto discusso, appare evidente che il salicilato non agisce solo a livello periferico (5), ma anche e soprattutto a livello centrale (11,14). La corteccia cerebrale è altamente plastica e mostra cambiamenti notevoli in risposta al salicilato sistemico, come mostrato dal brusco aumento di c-fos immunomarcata, un marker dell'attività neuronale (11). Tuttavia, gli studi elettrofisiologici hanno riportato risultati variabili. In alcuni casi i tassi di scarica spontanea

nell'A1 e nell'area uditiva anteriore (AAF) sono diminuiti leggermente dopo somministrazione di salicilato (14,30), mentre in altri si è riscontrato un aumento nella corteccia uditiva secondaria (A2) (57). I neuroni della corteccia uditiva primaria A1 ricevono principalmente input afferenti dalla via lemniscale e i neuroni dell'A2 ricevono informazioni afferenti dalla via extra-lemnisciale (58). La riduzione nel tasso di scarica spontanea di A1 dopo trattamento con SS può quindi essere dovuta alla soppressione degli output neuronali dalla coclea e dalla via uditiva classica, mentre la scarica spontanea elevata

osservata in A2 può riflettere i cambiamenti che si presentano nel SNC nelle regioni sia uditive che non uditive.

Un altro fattore che può contribuire all'aumento delle ampiezze della AC a livelli sovra soglia è la perdita dell'inibizione GABA-mediata. L'evidenza che sostiene questa ipotesi proviene da studi che mostrano che la somministrazione sistemica di Baclofen (che aumenta l'inibizione GABAB-mediata), l'anestesia con Isoflurano (che aumenta l'inibizione GABAA-mediata), o il Vigabatrin (che aumenta la concentrazione del neurotrasmettitore GABA), possono sopprimere l'iperattività indotta da salicilato nella AC (14). Questi risultati supportano l'ipotesi che l'iperattività indotta da salicilato osservata nella corteccia uditiva potrebbe essere dovuta ad una riduzione dell'inibizione GABA-mediata (16,18).

In condizioni normali, i circuiti GABAergici aiutano ad affinare la regolazione della frequenza dei neuroni nella AC. Quando l'attività GABA-mediata viene farmacologicamente soppressa, le aree ricettive di frequenza (FRFs) possono spostarsi o espandersi.

Le FRFs nella AC sono alterate anche da elevate dosi di salicilato, in accordo con gli effetti del salicilato su GABA (16,18). Approssimativamente 2,5 ore dopo il trattamento sistemico con SS,

si è verificato uno spostamento frequenza-dipendente delle FC e un allargamento delle curve di regolazione della AC (12). Questo è risultato in una sovra-rappresentazione delle frequenze medie (10-20 kHz), che è stato precedentemente riportato come una possibile frequenza percettiva per l'acufene indotto da salicilato (30).

Nella Figura 5 è possibile vedere le differenze di FC per i neuroni della corteccia uditiva prima e 2 ore dopo la somministrazione di salicilato (300 mg/kg i.p.). Molti neuroni con bassa FC hanno acutizzato la loro FC verso i 10-20 kHz, mentre diverse unità con FC acuta hanno abbassato la FC per avvicinarsi al range 10-20 kHz inducendo una sovra rappresentazione dei neuroni con FC vicina a 16 kHz. Il drammatico spostamento nelle FRFs in A1 potrebbe essere il risultato di due fattori. Il primo è l'input proveniente dalla periferia che è prevalentemente caratterizzato da frequenze medie rispetto alle frequenze basse e alte che sono invece attenuate dall'attività inibitoria del salicilato sulla contrattilità delle CCE; il secondo elemento è l'influenza del salicilato sull'attività GABAergica in quanto è stato dimostrato che il salicilato ha un effetto soppressorio sul GABA, riducendone l'attività inibitoria ed inducendo iperattività centrale (18,59,60).

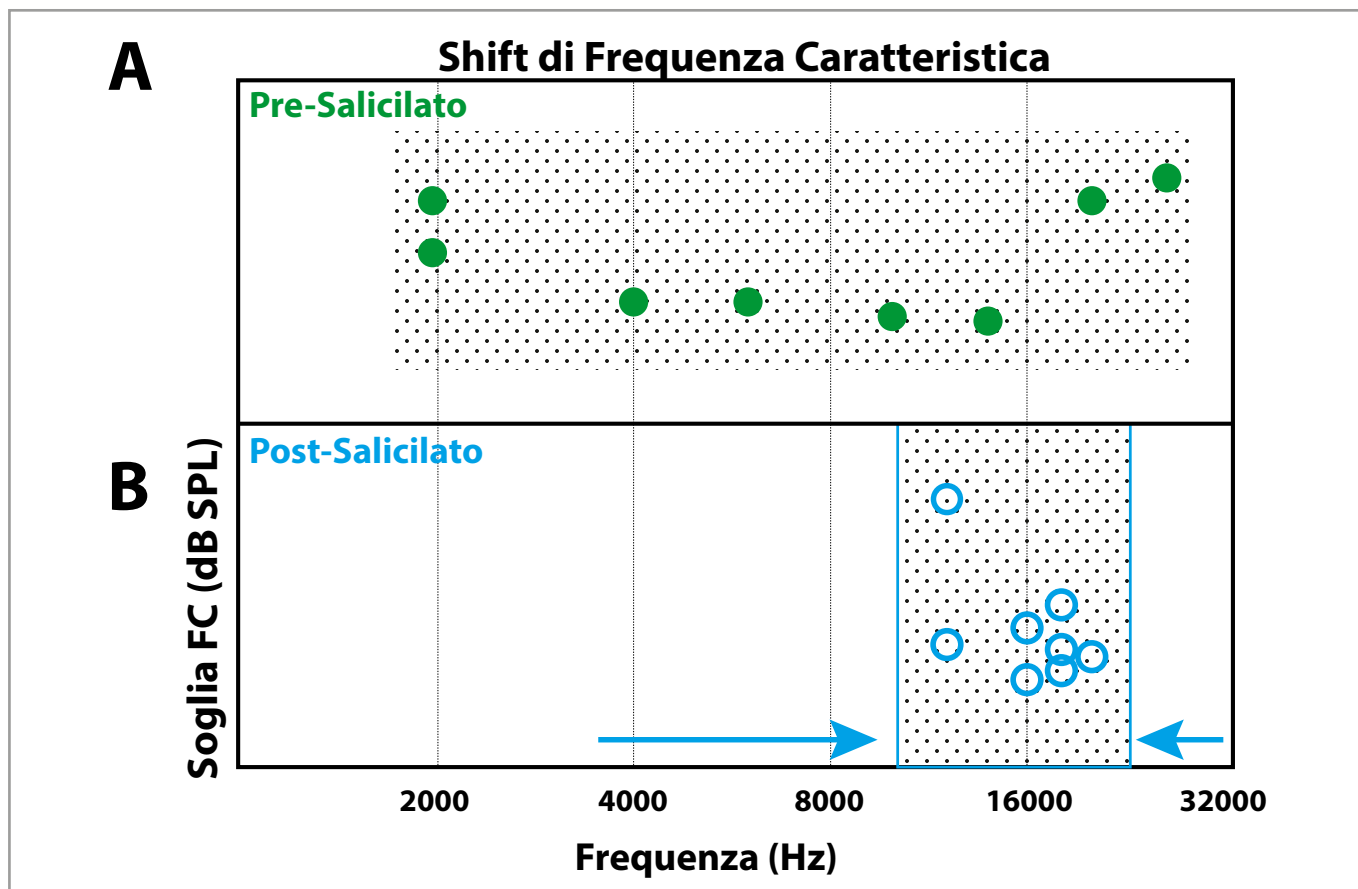


Figura 5. In questa figura è possibile apprezzare la variazione di FC dei neuroni della corteccia uditiva prima (A) e 2.5h dopo (B) la somministrazione di sodio salicilato (300 mg/kg i.p.). I neuroni con bassa FC hanno acutizzato la loro FC verso i 10-20 kHz, mentre le unità con FC acuta hanno abbassato la FC per avvicinarsi al range 10-20 kHz inducendo una sovra rappresentazione dei neuroni con FC vicina a 16kHz. È interessante che questa sia anche la frequenza a cui, sperimentalmente, gli animali percepiscono l'acufene indotto da salicilato.

Analogamente ad altre regioni della neocorteccia, la corteccia uditiva è costituita da circa sei strati interconnessi con una moltitudine di tipi di neuroni (61). Una valutazione *in vitro* ha rivelato differenze significative nella risposta di tipi diversi di neuroni nella AC dopo perfusione con 1.4 mM di salicilato. La soglia di corrente necessaria ad evocare un potenziale d'azione era significativamente aumentata e le scariche spontanee evocate da corrente negli interneuroni fast-spiking erano stati sostanzialmente depressi, mentre i neuroni piramidali non sembravano essere condizionati (62). Questi risultati indicano che il salicilato altera preferenzialmente la trasmissione GABAergica fast-spiking a carico di interneuroni in specifici strati corticali.

L'analisi della densità della sorgente di corrente (CSD) è stata utilizzata anche per studiare l'effetto del salicilato su LFP evocati da stimolo, provenienti da diversi strati della AC *in vivo*. L'analisi CSD migliora la localizzazione spaziale dei punti di origine (iperpolarizzazione) e di dissipazione (depolarizzazione) di corrente in diversi strati della AC, prendendo in considerazione i LFP registrati dagli elettrodi vicini. L'analisi CSD dei LFP guidati dal suono dalla regione A1 della AC ha mostrato che il salicilato sistemico ha avuto effetti maggiori su alcuni strati della corteccia uditiva rispetto ad altri (63).

SALICILATO E STRUTTURE UDITIVE NON CLASSICHE

I nuclei esterni della via uditiva classica rispondono in maniera interessante agli stimoli acustici, e perciò possono contribuire alle funzioni uditive coinvolte nella sensibilità uditiva e nella percezione dell'acufene. L'amigdala, parte del sistema limbico, gioca un ruolo importante nella regolazione emotiva e nell'attribuzione del significato emotivo agli stimoli sensoriali (64,65). Poiché l'intensità dell'acufene è spesso correlata a fattori individuali come tolleranza al fastidio, allo stress o alla depressione di un individuo, l'amigdala può svolgere un ruolo importante nell'insorgenza e, soprattutto, nella stabilizzazione dell'acufene.

L'organizzazione tonotopica è più complessa di quella della AC (19,66-68) e, in maniera simile a ciò che accade nella corteccia, la somministrazione sistemica di salicilato aumenta la frequenza di scarica, i LFPs ed altera la regolazione e la tonotopia delle FRFs (19). Come mostrato nella Figura 4, è stata valutata la risposta I/O della LA prima e dopo il trattamento con salicilato. Ad elevati livelli di intensità, si ottiene una iperattività della LA, mentre a bassi livelli di intensità la risposta viene soppressa e la soglia viene aumentata (19). Lo spostamento di soglia e la soppressione dei suoni di bassa intensità è un riflesso dell'effetto del salicilato sull'amplificazione delle CCE (5). Questi riscontri si accordano con le valutazioni morfologiche che mostrano che A1 ha numerose vie sottocorticali verso le regioni uditive non classiche, come l'amigdala e lo striato (69). L'iniezione di traccianti fluorescenti bidirezionali assionali nell'A1 del gerbillo ha indicato che il 76% delle vie nervose si estende alle strutture sottocorticali, mentre il 24% si estende alle strutture corticali (69). Presi insieme, questi dati indicano che il salicilato non solo condiziona la coclea, ma esercita anche effetti bidirezionali notevoli e ampiamente diffusi tra la via uditiva centrale e altre regioni del

SNC. Pertanto, l'insorgenza dell'acufene indotto da salicilato può coinvolgere un'attività neuronale anormale sia internamente che esternamente alla via uditiva classica.

GLI EFFETTI DEL SALICILATO SULL'UOMO

Finora abbiamo parlato degli effetti del sodio salicilato sulle varie strutture dell'apparato uditivo basandoci su evidenze di natura sperimentale animale. Naturalmente, gli stessi effetti, anche se con valenza e variabilità differente, possono essere riscontrati nell'uomo ove, in seguito ad ingestione di elevate dosi di salicilato, è stata riportata insorgenza di ipoacusia ed acufene. La maggior parte delle informazioni che hanno documentato tali effetti sono state ottenute principalmente da tentativi di suicidio, pazienti con artrite reumatoide e studi psicoacustici (8). Alcuni studi hanno suggerito che una dose moderata di aspirina può indurre una perdita uditiva fino a ~40 dB in soggetti a cui sono stati somministrati 4 gr di aspirina/die per 3-4 giorni (22), altri studi hanno documentato un'ipoacusia media di ~15 dB (4,8,70,71); nonostante ciò la maggior parte degli studi ha trascurato la valutazione dell'udito al di sopra di 8 kHz (8,72,73). Le variazioni di soglia si sono verificate prevalentemente per le frequenze acute (74,75), associate ad una completa abolizione delle emissioni otoacustiche spontanee (76). I livelli di salicilato nel plasma sembrano avere una buona correlazione con il grado di perdita uditiva (22,70).

In alcuni casi di tentativo di suicidio sono stati valutati gli effetti di dosi estreme di aspirina. In un paziente che aveva ingerito 10 gr di aspirina sono stati riscontrati ipoacusia severa ed intenso acufene entro le 22 ore (74); i prodotti di distorsione, seppur presenti, apparivano linearizzati, indicando una funzione ridotta delle CCE. Dopo il recupero è stata osservata una normalizzazione dei DPOAE con uno schema di risposta non lineare, ad indicare un completo ripristino della funzione delle CCE (74).

In un altro caso, gli effetti elettrofisiologici e percettivi di dosi estreme di aspirina (100 compresse di aspirina) includevano ipoacusia bilaterale ed acufene. I livelli di salicilato nel siero erano 606 mg/l e l'audiometria ha mostrato una perdita uditiva bilaterale di 30 dB, leggermente peggiore per le frequenze acute (77).

Le registrazioni EcochG hanno mostrato una forma d'onda bifasica indicativa di danno cocleare e una soglia di 50 dB. Un giorno dopo l'ingestione, il paziente ha riferito la diminuzione soggettiva dell'acufene e un miglioramento della sensibilità uditiva. L'audiogramma è tornato nei limiti e le registrazioni EcochG hanno mostrato una forma d'onda normale con una soglia di 20 dB (77).

Oltre ad ipoacusia ed acufene, il salicilato può avere notevoli effetti sulla discriminazione verbale. È ben noto che l'ipoacusia sensoriale può ridurre l'abilità di un individuo a percepire accuratamente un discorso in presenza di rumore anche quando il segnale è al livello di comoda udibilità (MCL) del soggetto. Young & Wilson et al. hanno esaminato gli effetti dell'acido acetilsalicilico sulla capacità di comprensione delle parole (World Recognition Score, WRS) in assenza e in presenza di un rumore di fondo.

Le misurazioni sono state ottenute a tre rapporti segnale/rumore

(SNR 0, -4, e -8 dB HL) prima e dopo elevate dosi di aspirina. I risultati medi provenienti da 5 soggetti hanno mostrato una riduzione significativa nella capacità di ricezione del discorso a una condizione di -8 SNR (Figura 6A). Tuttavia, quando i punteggi dei singoli soggetti sono stati esaminati singolarmente era chiaramente evidente che vi era ampia variabilità individuale (Figura 6B).

Come mostrato nella Figura 6B, i soggetti 1 e 2 hanno entrambi mostrato una minore capacità di discriminazione verbale nel rumore a seguito di elevate dosi di aspirina, anche se non hanno mostrato nessuna riduzione significativa nella soglia uditiva o discriminazione del discorso in ambiente silenzioso (20). Questo studio illustra la variabilità che il salicilato può avere sulla percezione uditiva degli stimoli sopra soglia.

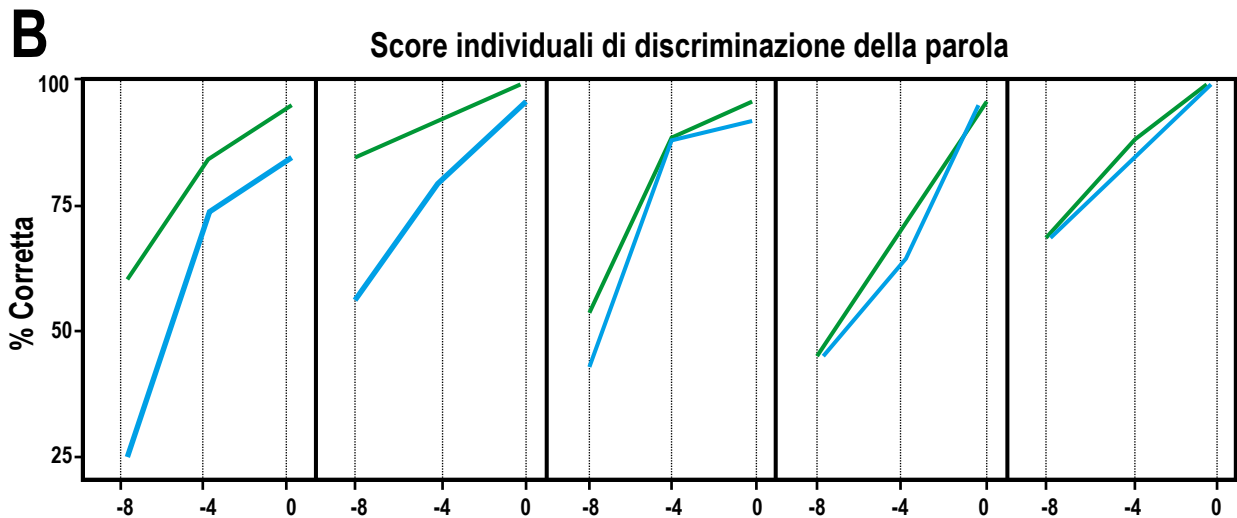
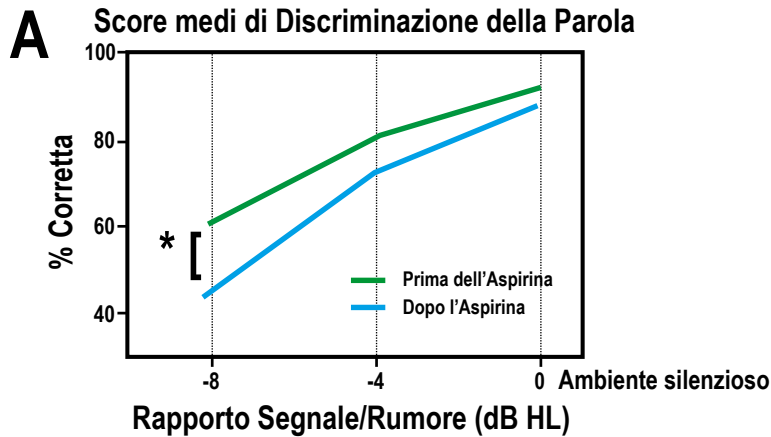


Figura 6. (A) Percentuale media degli WRS corretti, in presenza di rumore, in funzione del SNR. Dopo un'elevata dose di aspirina si è verificata una riduzione significativa della capacità di comprensione delle parole al valore SNR di -8 dB. (B) WRS individuali in presenza di rumore in funzione del SNR. Nel punteggio medio sembra che l'aspirina causi una significativa riduzione della capacità di comprensione delle parole in presenza di rumore; tuttavia quando gli score sono osservati individualmente sembra che l'effetto dell'aspirina sulla comprensione delle parole abbia ampia variabilità. WRS: score di comprensione delle parole; SNR: rapporto segnale/rumore.

A parte la discriminazione del discorso, il salicilato ha anche effetto sulla risoluzione temporale, ovvero sulla capacità di rilevare rapidi cambiamenti in un segnale acustico. Una semplice misura di risoluzione uditiva temporale è la capacità di percepire un breve intervallo di silenzio, o gap, durante un rumore continuo (78). Nell'udito normale le soglie di percezione del gap diventano più brevi (acuità temporale migliore) all'aumento dell'intensità del suono, raggiungendo un valore di intervallo minimo attorno ai 60 dB SPL. Per determinare se il salicilato possa danneggiare la risoluzione temporale, sono stati somministrati 3,9 g di aspirina al giorno a 5 pazienti per un periodo di 5 giorni consecutivi. I soggetti sono stati valutati sulla loro abilità di identificare accuratamente i gap di silenzio in un rumore di fondo a banda stretta fissato a 0.5 kHz o 3.5 kHz. Le misurazioni sono state ottenute prima e durante la somministrazione di aspirina. Dopo il salicilato, le soglie dei gap sono diventate più lunghe in 4 su 5 pazienti, quindi l'ipoacusia indotta da aspirina ha causato una risoluzione temporale peggiore (soglie dei gap più lunghe) (79). Questi risultati sono in accordo con altri studi che mostrano che la presbiacusia e l'ipoacusia indotta da rumore risultano in un peggioramento della risoluzione temporale. È inoltre interessante notare che la capacità di riconoscere un gap durante un rumore continuo è alla base del modello animale di valutazione dell'acufene mediante lo studio del riflesso di Startle (80, 81).

Conclusioni

Il salicilato è un farmaco che ha permesso ai ricercatori di indurre ipoacusia ed acufene in maniera ripetibile ed affidabile. Nella somministrazione a breve termine gli effetti sembrano essere completamente reversibili, laddove nella somministrazione a lungo termine sembrano insorgere danni irreversibili a livello dei neuroni del ganglio spirale del Corti. Mentre originariamente si riteneva che il salicilato avesse effetti solo sulla periferia del sistema uditivo, studi più recenti suggeriscono profondi effetti a livello centrale, fatto che non dovrebbe sorprendere dal momento che l'aspirina viene utilizzata per il sollievo di dolore, mal di testa e febbre.

Nella periferia uditiva, il salicilato agisce inibendo l'elettromotilità delle CCE agendo sulla proteina motrice prestina ed abbassando la soglia uditiva nell'animale da esperimento come nell'uomo. Nell'animale, gli effetti di attenuazione si verificano prevalentemente per le frequenze gravi e acute, meno per quelle medie. Tuttavia, negli esseri umani le misurazioni hanno mostrato un maggiore spostamento di soglia alle alte frequenze (74,75). Durante test sopra soglia negli uomini, ad esempio la comprensione delle parole in presenza di rumore, gli effetti del salicilato variano da individuo a individuo; alcuni soggetti mostrano difficoltà di comprensione del discorso a tutti gli SNR, mentre altri non mostrano quasi nessuna alterazione (20). Lo spettro sonoro delle parole è tale che le consonanti contengono principalmente suoni ad alte frequenze, mentre le vocali contengono

principalmente suoni a basse frequenze. Se l'udito è compromesso per le alte frequenze, a causa dell'ototossicità da salicilato, si comprometterà anche la capacità dell'individuo di discriminare in maniera efficace i suoni delle consonanti. In maniera sorprendente non c'è stata nessuna apparente correlazione fra la severità della perdita uditiva alle alte frequenze indotta da salicilato e i punteggi di riconoscimento del discorso. Inoltre, negli esseri umani non sembra esserci un effetto frequenza-dipendente sulle capacità di integrazione temporale.

Alla luce dei cambiamenti osservati nella coclea, gli effetti del salicilato sul SNC sembrano paradossali. Mentre il salicilato ha soppresso l'output nervoso della coclea, ha innalzato i LFP ed la frequenza di scarica nel SNC. L'analisi del CSD ha indicato che il segnale nervoso amplificato nella corteccia uditiva deriva da cambiamenti nei circuiti intra-corticali in A1. Gli aumenti dell'ampiezza osservati ad alte intensità di stimolazione sono stati osservati nella corteccia uditiva primaria e recentemente nelle strutture uditive non classiche come l'amigdala. Mentre il salicilato sistemico non ha portato ad un aumento dell'ampiezza del collicolo inferiore, le risposte a questo livello sono state depresse molto meno rispetto a quelle nella coclea. Una possibile spiegazione di questi risultati è che alcune amplificazioni del segnale che si verificano tra la coclea e il mesencefalo compensano parzialmente l'output cocleare ridotto. Il trattamento sistemico con salicilato ha indotto anche variazioni significative della frequenza caratteristica nella corteccia uditiva così come nell'amigdala laterale, risultando in una sovra-rappresentazione delle frequenze medie.

Molto interessante notare che questa alterazione corrisponde alla tonalità dell'acufene indotto sperimentalmente nell'animale dal salicilato (12-16 kHz).

Non sono ben chiari i meccanismi responsabili di questa variazione; tuttavia è molto probabile che sia dovuto a due fattori: il primo è l'input proveniente dalla periferia che è prevalentemente caratterizzato da frequenze medie rispetto alle frequenze basse e alte che sono invece attenuate dall'attività inibitoria del salicilato sulle CCE. Il secondo elemento è l'influenza del salicilato sull'attività GABAergica; è stato difatti dimostrato che il salicilato ha un effetto soppressorio sul GABA, riducendo l'attività inibitoria di questo ed inducendo una iperattività centrale. Questi risultati suggeriscono che le variazioni della frequenza caratteristica indotte da salicilato osservate nella corteccia uditiva e nell'amigdala laterale possono essere il risultato di effetti periferici di selezione di uno specifico range di frequenze e di perdita di inibizione centrale che crea un ambiente permissivo e quindi favorente la riorganizzazione corticale e, di conseguenza, la cronicizzazione dell'acufene.

In conclusione, gli studi sull'ototossicità indotta da salicilato e aspirina hanno accresciuto la nostra conoscenza sulla percezione uditiva e sull'acufene; tuttavia, i meccanismi con cui il salicilato induce acufene, ipoacusia ed alterazioni della via uditiva centrale non sono ancora completamente chiari.

Bibliografia

1. Myers EN, Bernstein JM. Salicylate ototoxicity; a clinical and experimental study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1965; 82:483-93.
2. Cazals Y. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol* 2000; 62:583-631.
3. Lobarinas E, Sun W, Cushing R, et al. A novel behavioral paradigm for assessing tinnitus using schedule-induced polydipsia avoidance conditioning (SIP-AC). *Hear Res* 2004; 190:109-14.
4. Cianfrone G, Pace M, Turchetta R, et al. An updated guide on drugs inducing ototoxicity, tinnitus and vertigo. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2005; 25:3-31.
5. Chen GD, Kermany MH, D'Elia A, Ralli M, et al. Too much of a good thing: long-term treatment with salicylate strengthens outer hair cell function but impairs auditory neural activity. *Hear Res* 2010; 265:63-9.
6. Deng L, Ding D, Su J, et al. Salicylate selectively kills cochlear spiral ganglion neurons by paradoxically up-regulating superoxide. *Neurotox Res* 2013; 24:307-19.
7. Day RO, Graham GG, Bieri D, et al. Concentration-response relationships for salicylate-induced ototoxicity in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28:695-702.
8. McFadden D, Plattsmier HS, Pasanen EG. Aspirin-induced hearing loss as a model of sensorineural hearing loss. *Hear Res* 1984; 16:251-60.
9. Mongan E, Kelly P, Nies K, et al. Tinnitus as an indication of therapeutic serum salicylate levels. *JAMA* 1973; 226:142-5.
10. Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT. An animal model for tinnitus. *Laryngoscope* 1988; 98:280-6.
11. Wallhauser-Franke E, Mahlke C, Oliva R, et al. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp Brain Res* 2003; 153:649-54.
12. Stolzberg D, Chen GD, Allman BL, et al. Salicylate-induced peripheral auditory changes and tonotopic reorganization of auditory cortex. *Neuroscience* 2011; 180:157-64.
13. Sun W, Lu J, Stolzberg D, et al. Salicylate increases the gain of the central auditory system. *Neuroscience* 2009; 159:325-34.
14. Lu J, Lobarinas E, Deng A, et al. GABAergic neural activity involved in salicylate-induced auditory cortex gain enhancement. *Neuroscience* 2011; 189:187-98.
15. Sheppard A, Hayes SH, Ralli M, et al. Review of salicylate-induced hearing loss, neurotoxicity, tinnitus and neuropathophysiology. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014 Apr; 34(2):79-93.
16. Ralli M, Lobarinas E, Fetoni AR, et al. Comparison of salicylate- and quinine-induced tinnitus in rats: development, time course, and evaluation of audiologic correlates. *Otol Neurotol* 2010 Jul; 31(5):823-31
17. Bauer CA, Brozoski TJ, Holder TM, et al. Effects of chronic salicylate on GABAergic activity in rat inferior colliculus. *Hear Res* 2000; 147:175-82.
18. Liu J, Li X, Wang L, et al. Effects of salicylate on serotonergic activities in rat inferior colliculus and auditory cortex. *Hear Res* 2003; 175:45-53.
19. Wang HT, Luo B, Huang YN, et al. Sodium salicylate suppresses serotonin-induced enhancement of GABAergic spontaneous inhibitory postsynaptic currents in rat inferior colliculus in vitro. *Hear Res* 2008; 236:42-51.
20. Chen GD, Manohar S, Salvi R. Amygdala hyperactivity and tonotopic shift after salicylate exposure. *Brain Res* 2012; 1485:63-76.
21. Young LL, Jr., Wilson KA. Effects of acetylsalicylic acid on speech discrimination. *Audiology* 1982; 21:342-9.
22. Hicks ML, Bacon SP. Effects of aspirin on psychophysical measures of frequency selectivity, two-tone suppression, and growth of masking. *J Acoust Soc Am* 1999; 106:1436-51.
23. Pedersen CB. Brief-tone audiometry in persons treated with salicylate. *Audiology* 1974; 13:311-9.
24. Liberman MC, Gao J, He DZ, et al. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 2002; 419:300-4.
25. Schmiedt RA, Lang H, Okamura HO, et al. Effects of furosemide applied chronically to the round window: a model of metabolic presbycusis. *J Neurosci* 2002; 22:9643-50.
26. Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflügers Arch* 2004; 447:710-21.
27. Dallos P. Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18:370-6.
28. Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, et al. Behavioral model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121:457-62.
29. Jastreboff PJ, Sasaki CT. An animal model of tinnitus: a decade of development. *Am J Otol* 1994; 15:19-27.
30. Lobarinas E, Dalby-Brown W, Stolzberg D, et al. Effects of the potassium ion channel modulators BMS-204352 Maxipost and its R-enantiomer on salicylate-induced tinnitus in rats. *Physiol Behav* 2011; 104:873-9.
31. Yang G, Lobarinas E, Zhang L, et al. Salicylate induced tinnitus: behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats. *Hear Res* 2007; 226:244-53.
32. Yu N, Zhu ML, Johnson B, et al. Prestin up-regulation in chronic salicylate (aspirin) administration: an implication of functional dependence of prestin expression. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2407-18.
33. Jastreboff PJ. Phantom auditory perception (tinnitus): mechanisms of generation and perception. *Neurosci Res* 1990; 8:221-54.
34. Eggermont JJ. Tinnitus: neurobiological substrates. *Drug Discov Today* 2005; 10:1283-90.
35. Wei L, Ding D, Salvi R. Salicylate-induced degeneration of cochlea spiral ganglion neurons-apoptosis signaling. *Neuroscience* 2010; 168:288-99.
36. Zheng JL, Gao WQ. Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur J Neurosci* 1996; 8:1897-905.
37. Raslear TG. The use of the cochlear microphonic response as an index of auditory sensitivity: review and evaluation. *Psychol Bull* 1974; 81:791-803.
38. Durrant JD. Contralateral suppression of otoacoustic emissions--delay of effect? *J Commun Disord* 1998; 31:485-8,553.
39. Puel JL, Bobbin RP, Fallon M. Salicylate, mefenamate, meclofenamate, and quinine on cochlear potentials. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102:66-73.
40. Fitzgerald JJ, Robertson D, Johnstone BM. Effects of intracochlear perfusion of salicylates on cochlear microphonic and other auditory responses in the guinea pig. *Hear Res* 1993; 67:147-56.
41. Feng H, Yin SH, Tang AZ, et al. Caspase-3 activation in the guinea pig cochlea exposed to salicylate. *Neurosci Lett* 2010; 479:34-9.
42. Li G, Sha SH, Zotova E, et al. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest* 2002; 82:585-96.
43. Coleman J, Huang X, Liu J, et al. Dosing study on the effectiveness of salicylate/N-acetylcysteine for prevention of noise-induced hearing loss. *Noise Health* 2010; 12:159-65.
44. Evans EF, Borerwe TA. Ototoxic effects of salicylates on the responses of single cochlear nerve fibres and on cochlear potentials. *Br J Audiol* 1982; 16:101-8.
45. Muller M, Klinke R, Arnold W, et al. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited. *Hear Res* 2003; 183:37-43.
46. Wilcke JR. Idiosyncrasies of drug metabolism in cats. Effects on pharmacotherapeutics in feline practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1984; 14:1345-54.
47. Boothe DM. Drug therapy in cats: a systems approach. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196:1502-11.
48. Cazals Y, Horner KC, Huang ZW. Alterations in average spectrum of cochleoneural activity by long-term salicylate treatment in the guinea pig: a plausible index of tinnitus. *J Neurophysiol* 1998; 80:2113-20.
49. Ruel J, Chabbert C, Nouvian R, et al. Salicylate enables cochlear arachidonic-acid-sensitive NMDA receptor responses. *J Neurosci* 2008; 28:7313-23.
50. Kiang NY, Liberman MC, Levine RA. Auditory-nerve activity in cats exposed to ototoxic drugs and high-intensity sounds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976; 85:752-68.
51. Sivaramakrishnan S, Sterbing-D'Angelo SJ, Filipovic B, et al. GABA(A) synapses shape neuronal responses to sound intensity in the inferior colliculus. *J Neurosci* 2004; 24:5031-43.

52. Fuzessery ZM, Hall JC. Role of GABA in shaping frequency tuning and creating FM sweep selectivity in the inferior colliculus. *J Neurophysiol* 1996; 76:1059-73.
53. Faingold CL, Gehlbach G, Caspary DM. On the role of gaba as an inhibitory neurotransmitter in inferior colliculus neurons - iontophoretic studies. *Brain Res* 1989; 500:302-12.
54. Chen GD, Jastreboff PJ. Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats. *Hear Res* 1995; 82:158-78.
55. Ma WL, Hidaka H, May BJ. Spontaneous activity in the inferior colliculus of CBA/J mice after manipulations that induce tinnitus. *Hear Res* 2006; 212:9-21.
56. Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, et al. Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:15222-7.
57. Basta D, Goetze R, Ernst A. Effects of salicylate application on the spontaneous activity in brain slices of the mouse cochlear nucleus, medial geniculate body and primary auditory cortex. *Hear Res* 2008; 240:42-51.
58. Eggermont JJ, Kenmochi M. Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in secondary auditory cortex. *Hear Res* 1998; 117:149-60.
59. Huang CL, Winer JA. Auditory thalamocortical projections in the cat: Laminar and areal patterns of input. *J Comp Neurol* 2000; 427:302-31.
60. Lobarinas E, Yang G, Sun W, et al. Salicylate- and quinine induced tinnitus and effects of memantine. *Acta Otolaryngol* 2006; 126:13-9.
61. Wang J, Caspary D, Salvi RJ. GABA-A antagonist causes dramatic expansion of tuning in primary auditory cortex. *Neuroreport* 2000; 11:1137-40.
62. Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA. Laminar distribution and neuronal targets of gabaergic axon terminals in cat primary auditory-cortex (Ai). *J Comp Neurol* 1994; 344:383-402.
63. Su YY, Luo B, Wang HT, et al. Differential effects of sodium salicylate on current-evoked firing of pyramidal neurons and fast-spiking interneurons in slices of rat auditory cortex. *Hear Res* 2009; 253:60-6.
64. Stolberg D, Chrostowski M, Salvi RJ, et al. Intracortical circuits amplify sound-evoked activity in primary auditory cortex following systemic injection of salicylate in the rat. *J Neurophysiol* 2012; 108:200-14.
65. Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15:353-75.
66. Fanselow MS, LeDoux JE. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 1999; 23:229-32.
67. Dobie RA. Depression and tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 2003; 36:383-8.
68. Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 1995; 15:1029-39.
69. Goossens KA, Hobin JA, Maren S. Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 2003; 40:1013-22.
70. Budinger E, Laszcz A, Lison H, et al. Non-sensory cortical and subcortical connections of the primary auditory cortex in Mongolian gerbils: bottom-up and top-down processing of neuronal information via field A1. *Brain Res* 2008; 1220:2-32.
71. McFadden D, Plattsmier HS. Aspirin can potentiate the temporary hearing loss induced by intense sounds. *Hear Res* 1983; 9:295-316.
72. Mcfadden D, Champlin CA. Reductions in overshoot during aspirin use. *J Acoust Soc Am* 1990; 87:2634-42.
73. Carlyon RP, Butt M. Effects of aspirin on human auditory filters. *Hear Res* 1993; 66:233-44.
74. Brown AM, Williams DM, Gaskill SA. The effect of as aspirin on cochlear mechanical tuning. *J Acoust Soc Am* 1993; 93:3298-307.
75. Janssen T, Boege P, Oestreicher E, et al. Tinnitus and 2f1-f2 distortion product otoacoustic emissions following salicylate overdose. *J Acoust Soc Am* 2000; 107:1790-2.
76. Mccabe PA, Dey FL. Effect of aspirin upon auditory sensitivity. *Ann Oto Rhinol Laryn* 1965; 74:312-324.
77. McFadden D, Plattsmier HS. Aspirin abolishes spontaneous oto-acoustic emissions. *J Acoust Soc Am* 1984; 76:443-8.
78. Ramsden RT, Latif A, O'Malley S. Electrocochleographic changes in acute salicylate overdosage. *J Laryngol Otol* 1985; 99:1269-73.
79. Zwislocki JJ. Theory of temporal auditory summation. *J Acoust Soc Am* 1960; 32:1046-60.
80. Ralli M, Lobarinas E, Fetoni AR, et al. Comparison of salicylate- and quinine-induced tinnitus in rats: development, time course, and evaluation of audiologic correlates. *Otol Neurotol* 2010 Jul; 31(5):823-31.
81. Ralli M, Troiani D, Podda MV, et al. The effect of the NMDA channel blocker memantine on salicylate-induced tinnitus in rats. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014 Jun; 34(3):198-204.