



Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

**Association between interleukin-6 polymorphism in the
-174 G/C region and hearing loss in the elderly with a history
of occupational noise exposure^{☆,☆☆}**

Miula Portelinha Braga^a, Sandra Mara Maciel^{b,c}, Luciana Lozza de Moraes Marchiori^{a,d,*},
Regina Célia Poli-Frederico^{a,e}

^a Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR, Brasil

^b University of London, Londres, Reino Unido

^c Departamento de Odontologia Pediátrica, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

^d Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

^e Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

Recebido em 29 de julho de 2013; aceito em 1 de fevereiro de 2014

KEYWORDS

Occupational noise
Sensorineural hearing
loss;
Cytokines

Abstract

Introduction: The biological processes involved in noise-induced hearing loss (NIHL) are still unclear. The involvement of inflammation in this condition has been suggested.

Objective: To investigate the association between interleukin - 6 (IL-6) polymorphism and susceptibility to NIHL.

Methods: This was a cross-sectional study with a sample of 191 independent elderly individuals aged > 60 years of age. Information on exposure to occupational noise was obtained by interviews. Audiological evaluation was performed using pure tone audiometry and genotyped through PCR by restriction fragment length polymorphism - PCR-RFLP. Data were analyzed using the Chi-square test and the Odds ratio (OR), with the significance level set at 5%.

Results: Among elderly with hearing loss (78.0%), 18.8% had a history of exposure to occupational noise. There was a statistically significant association between the genotype frequencies of the IL-6 -174 and NIHL. The elderly with the CC genotype were less likely to have hearing loss due to occupational noise exposure when compared to those carrying the GG genotype (OR = 0.0124; 95% CI 0.0023-0.0671; p < 0.001).

Conclusion: This study suggests there is an association of polymorphisms in the IL- 6 gene at position - G174C with susceptibility to noise-induced hearing loss.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.07.001>

*Como citar este artigo: Braga MP, Maciel SM, Marchiori LL, Poli-Frederico RC. Association between interleukin-6 polymorphism in the -174 G/C region and hearing loss in the elderly with a history of occupational noise exposure. Braz J Otorhinolaryngol. 2014;80:373-8.

**Instituição: Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: luciana.marchiori@unopar.br (L.L.M. Marchiori).

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

PALAVRAS-CHAVE
 Ruído ocupacional;
 Perda auditiva
 neurossensorial;
 Citocinas

Associação entre interleucina-6 polimorfismo na região de -174 G/C e perda auditiva em idosos com história de exposição ao ruído ocupacional

Resumo

Introdução: Os processos biológicos envolvidos na perda auditiva induzida por ruído (PAIR) ainda não estão claros. O envolvimento de processo inflamatório nesta condição tem sido sugerido.

Objetivo: Investigar a associação entre o polimorfismo no gene da interleucina-6 (IL-6) e a suscetibilidade à PAIR.

Método: Trata-se de estudo transversal com amostra de 191 idosos independentes acima de 60 anos de idade. Informações sobre a exposição ao ruído ocupacional foram obtidas por entrevistas. A avaliação audiológica foi realizada por meio de audiometria tonal liminar e a genotipagem pela técnica da PCR-RFLP. Os dados foram analisados usando-se o teste Qui-quadrado e a razão de chances (OR), com o nível de significância fixado em 5%.

Resultados: Entre os idosos com perda auditiva (78,0%), 18,8% apresentavam histórico de exposição ao ruído ocupacional. Houve associação estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas da IL-6 -174 e a PAIR. Os idosos portadores do genótipo CC foram menos propensos a apresentar perda auditiva por exposição ao ruído ocupacional quando comparados a aqueles portadores do genótipo GG (OR = 0,0124; 95% IC 0,0023-0,0671; $p < 0,001$).

Conclusão: O presente estudo sugere a associação do polimorfismo no gene da IL-6 na posição -G174C com a suscetibilidade à perda auditiva induzida por ruído.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

A saúde do idoso tem despertando cada vez mais o interesse dos pesquisadores, uma vez que a população está envelhecendo, sendo uma realidade tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento.¹ Estima-se que até 2040 os países em desenvolvimento tenham um bilhão de pessoas com 60 anos ou mais.² Devido à grande velocidade e à extensão desse crescimento, o cuidado com este grupo específico é essencial, de modo que possam envelhecer de forma saudável e com qualidade de vida.³

Os tipos mais comuns de perda auditiva são a presbiacusia (envelhecimento) e a perda auditiva induzida por ruído⁴ (PAIR). A PAIR se deve à exposição contínua a níveis intensos de ruídos, resultando em diminuição gradual da acuidade auditiva, geralmente sendo bilateral, simétrica, neurossensorial e irreversível. Comumente manifesta-se nas altas frequências audiométricas de 3.000 a 6.000 Hz.⁵ A etiologia da perda auditiva possui, além dos componentes ambientais, os genéticos e, mais recentemente, foi avaliada a indução de respostas inflamatórias e aumento da regulação de citocinas pró-inflamatórias no ouvido interno na presença de ruído exacerbado.⁵⁻⁷ A existência de células inflamatórias no estado estacionário e seu aumento após lesões no ouvido interno têm sido relatados por vários pesquisadores.^{6,8-10}

A exposição ao ruído induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina-6¹¹ (IL-6). So et al.¹² observaram uma *up*-regulação transitória de IL-6 em modelos animais tratados com cisplatina. Wakabayashi et al.¹³ investigaram o efeito da inibição da IL-6 usando um anticorpo anti-IL-6 (MR16-1) em camundongos. Estes autores verificaram que o MR16-1 apresentou efeito protetor

contra a lesão coclear induzida pelo ruído, principalmente devido à supressão da perda neuronal e, presumivelmente, através do alívio da resposta inflamatória. Dados semelhantes foram encontrados por Nakamoto et al.¹⁴ Estes autores sugeriram que a supressão da citocina pró-inflamatória HSF-1 na cóclea pela administração de GGA (geranilgeranilacetona) pode ser uma importante forma de proteção do ouvido interno.

A expressão de citocinas pode ser influenciada pela variação genética, resultando em condições patogênicas,¹⁵ e vários estudos têm investigado polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) como fatores de risco para doenças inflamatórias.¹⁶ Estes SNPs podem afetar a expressão, secreção e transporte celular das interleucinas,^{17,18} e podem também diminuir o nível do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra), o que aumenta a produção e atividade da IL-1 β .¹⁹

O SNP na região -174 do gene da interleucina-6 consiste na troca de G por C, sendo que a presença do alelo C representa uma função protetora, devido à produção reduzida da IL-6.²⁰

Considerando que na PAIR está envolvido o processo inflamatório, este trabalho teve por objetivo avaliar a associação entre o polimorfismo no gene da citocina pró-inflamatória-6 (IL-6) e a suscetibilidade à PAIR em idosos brasileiros fisicamente independentes.

Método

População de estudo

Este estudo transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade do Norte do Paraná

(0070/09). É parte de uma investigação mais ampla, o “Estudo sobre envelhecimento e longevidade”, que foi realizado em Londrina desde 2009. A cidade de Londrina (aproximadamente 500.000 habitantes) está situada na região norte do estado do Paraná, Brasil.

A partir de uma população de 43.610 idosos matriculados nas 38 unidades básicas de saúde na área urbana da cidade, o tamanho da amostra foi definido em 343 indivíduos, considerando um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro aceitável de 5%.²¹ Visando a representatividade amostral, foi realizada a estratificação aleatória considerando o gênero e as regiões da cidade. Foram incluídos no estudo indivíduos com 60 anos ou mais, de ambos os sexos, que se encontravam vivendo de forma independente, e estes foram classificados nos níveis 3 ou 4, como proposto por Spirduso.²² Esta classificação avalia o nível de independência dos idosos: o nível 1 indica uma falta de mobilidade, e o nível 5 indica atletas. Os idosos que tinham alguma doença ou limitação que impedisse a realização dos testes, como deficiência física ou mental, foram excluídos da amostra. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Avaliação audiológica

A avaliação audiológica foi realizada através de audiometria tonal liminar convencional com audiômetro da marca *Interacoustics*. Para determinar a severidade da perda auditiva, foram usados: os critérios propostos pela BIAP - *Bureau International d'Audio Phonologie* - instituição formada por diversas associações de países europeus com o objetivo principal de nortear a atividade dos profissionais dessas regiões; a média dos limiares auditivos em dB, na via aérea, nas frequências de 500 Hz, 1kHz, 2kHz e 4kHz; a recomendação 02/1 de 1997 analisadas; e ambas as orelhas direita e esquerda foram avaliadas para grupo de indivíduos com histórico de ruído ocupacional e para o grupo de indivíduos sem histórico de ruído ocupacional.²³⁻²⁵

Avaliação da exposição ocupacional ao ruído

A avaliação da exposição ocupacional ao ruído foi obtida através de entrevistas com os idosos participantes, usando um questionário semiestruturado. Foram coletadas informações sobre se o trabalho era realizado ou não em ambiente barulhento, quantos anos de trabalho em um ambiente barulhento e se usavam aparelho auditivo. Além disso, foram coletadas características demográficas (gênero, idade e etnia).

Genotipagem para o polimorfismo do gene da IL-6 G-174C (rs1800795)

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos a vácuo contendo 6% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o DNA foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando o protocolo descrito por Olerup e Zeterquist.²⁶

A partir das amostras originais, o DNA foi diluído para uma concentração de 100 ng/mL. A concentração foi determinada em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (Biomate 3, *Thermo Fisher Scientific*, Madison, EUA).

O sítio polimórfico C para T, situado na posição -174 do gene da IL-6 (rs1800795), foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), resultando em um fragmento de 99 pb. A PCR continha uma mistura de tampão pH 8,0 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 8 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos, 1 μM de cada um dos iniciadores e 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA). Os iniciadores utilizados foram: F-5' TTTG TCA AGA CAT GCC AAG TGC T- 3' e R-5' GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-3'²⁷ (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA).

A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (TC-512 Resistência Techne, Burlington, Nova Jersey, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto, e extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

O produto da PCR foi digerido com 2U da enzima de restrição NlaIII (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) *overnight* a 65 °C. Os fragmentos digeridos foram separados em géis de agarose a 2% (*Invitrogen Life Technologies*, São Paulo, Brasil). Uma amostra com o genótipo conhecido foi usado como controle positivo da PCR, e para o controle negativo foi utilizada água ultrapura.

O marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (Ladder - *Invitrogen*) foi incluído em cada gel corado com SybrSafe (*Invitrogen Life Technologies*, São Paulo, Brasil) e visualizados sob iluminação UV. A leitura e interpretação dos géis de agarose foram feitas com o programa LabImage L-PIX (HE) 1D-L340 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Foram observados os fragmentos de 13, 227 e 59 pb (alelo G), e fragmentos de 13, 118, 109 e 59 pb (alelo C).

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para testar a associação entre a frequência genotípica e a perda auditiva relacionada à história de exposição ocupacional ao ruído, o teste do Qui-quadrado foi realizado. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado em cada grupo utilizando o teste do Qui-quadrado. A razão de chances (OR) com intervalo de confiança de 95% (95% IC) foi calculada. O nível de significância foi fixado em 5%.

Resultados

Do total de 343 idosos, os procedimentos de genética molecular foram conduzidos em 191 deles. Destes, 31,9% relataram histórico de exposição ao ruído, com 18,8% apresentando perda auditiva. Dos 68,1% sem histórico de exposição ao ruído, 59,2% apresentavam perda auditiva. A média de idade foi de 67,8 ± 5,3 anos, havendo maior proporção (58,6%) de idosos do gênero feminino (tabela 1).

Dos idosos avaliados, 56% foram homocigóticos para o alelo G, 7,8% para o alelo C, e 36,2% foram heterocigóticos (tabela 1). A distribuição genotípica para o gene IL-6 estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas e alélicas do gene da IL-6 -174 (rs1800795) e a perda auditiva entre os idosos com história de exposição ao ruído ocupacional ($p < 0,001$) (tabela 1).

Tabela 1 Características gerais e frequências alélicas e genotípicas entre os idosos brasileiros (n = 191)

Características	n	%
Gênero		
Masculino	79	41,4
Feminino	112	58,6
Idade (anos)		
60-64	63	33,0
65-74	104	54,5
75 ou +	24	12,6
Média 67,8 (DP = 5,3)		
História de exposição ao ruído		
Sem história de exposição ao ruído		
Sem perda auditiva	17	8,9
Com perda auditiva	113	59,2
Com história de exposição ao ruído		
Sem perda auditiva	25	13,1
Com perda auditiva	36	18,8
Frequência genotípica		
GG	107	56,0
CC	15	7,8
GC	69	36,2
Frequência alélica		
G	283	74,1
C	99	25,9

la 2). Os idosos portadores do genótipo CC foram menos propensos a ter perda auditiva por exposição ao ruído ocupacional em relação aos idosos portadores do genótipo GG (OR = 0,0124; 95% IC 0,0023-0,0671; p < 0,0001). Entretanto,

tal associação não foi verificada no grupo de idosos sem histórico de exposição ao ruído ($\chi^2 = 0,078$; p = 0,961).

Discussão

Embora o mecanismo e a função de citocinas pró-inflamatórias na PAIR ainda não estejam bem esclarecidos, sabe-se que a estrutura e a expressão de citocinas pode ser influenciadas pela variação genética, como, por exemplo, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), o que resulta em consequências patológicas evidentes.¹⁵ A funcionalidade de SNPs, no que diz respeito à expressão do gene, é um assunto importante em estudos de associação a doenças.¹⁶

No presente estudo as frequências dos alelos G e C na população estudada foram de 74,1% e 25,9%, respectivamente. Outros estudos também têm demonstrado a predominância do alelo ancestral (G), variando entre 60% e 70%.²⁸ Em adição, foi observada uma maior frequência do genótipo GG (56%), seguida pelo GC (36,2%) e CC (7,8%). Este fato é consistente com os estudos citados anteriormente.^{20,28}

Foi observada associação entre o genótipo GG de IL-6 e perda auditiva com história de exposição ao ruído ocupacional ($\chi^2 = 40,201$; p < 0,001). Os idosos portadores do genótipo CC apresentaram menor propensão à perda auditiva por exposição ocupacional ao ruído (OR = 0,0124; 95% IC 0,0023-0,0671; p < 0,01) em relação aos idosos portadores do genótipo GG. A presença do alelo C resulta em uma menor expressão da IL6 após um estímulo inflamatório em comparação com o alelo G.²⁹ Sugere-se que o genótipo CC confira uma influência protetora contra o desenvolvimento de comorbidades, o pôde ser constatada nesta análise, quando a frequência do alelo C no grupo

Tabela 2 Associação entre a frequência genotípica para o gene da interleucina-6 G-174C e a perda auditiva relacionada à história de exposição ocupacional ao ruído (n = 191)

Exposição ocupacional ao ruído	Genotipagem	Sem perda auditiva	Com perda auditiva	Valor de p
		n (%)	n (%)	
Sem histórico	Frequência genotípica			0,961 ^a
	GG	09 (52,9)	62 (54,9)	
	CC	01 (05,9)	08 (07,0)	
	GC	07 (41,2)	43 (38,1)	
	Frequência alélica			0,8696 ^b
	G	25 (73,5)	167 (76,9)	
Com histórico	Frequência genotípica			< 0,01 ^c
	GG	03 (12,0)	33 (91,7)	
	CC	04 (16,0)	02 (05,5)	
	GC	18 (72,0)	01 (02,8)	
	Frequência alélica			< 0,01 ^d
	G	24 (48,0)	67 (93,0)	
C	26 (52,0)	05 (07,0)		

^a $\chi^2 = 0,078$.

^b $\chi^2 = 0,027$.

^c $\chi^2 = 40,201$.

^d $\chi^2 = 31,605$.

de perda auditiva sem exposição ao ruído foi maior do que no grupo PAIR.

Os estudos de Hirose et al.⁶ e Fujioka et al.¹¹ apontaram a possibilidade de alterações inflamatórias na cóclea após o estímulo por ruído. Fujioka et al.¹¹ demonstraram pela primeira vez a indução de citocinas pró-inflamatórias na cóclea exposta ao ruído e observaram a expressão aumentada das interleucinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, 3 horas após a exposição ao ruído. Estes autores ressaltaram que este mecanismo é de autoproteção contra a exposição à grande quantidade de ruído, e a consequente expressão excessiva de interleucinas por longos períodos deve piorar a função coclear.

Os achados de So et al.¹² demonstraram claramente que a IL-6 atua como um indutor de lesão coclear aguda, pois após a exposição dos animais com cisplatina ocorreu uma *up*-regulação transitória de IL-6. Alguns estudos têm evidenciado que a inibição da produção da IL-6 apresenta um efeito protetor coclear. Wakabayashi et al.²¹ utilizaram o anticorpo anti-IL-6 (MR10-1) para inibir a produção de IL-6 em camundongos, verificando um efeito protetor para a lesão coclear induzida pelo ruído. Nesta mesma linha de investigação, Nakamoto et al.¹⁴ verificaram que a droga geranylacetona (GGA) estimula a expressão do gene HSF que, por sua vez, inibe a inflamação na cóclea, protegendo o ouvido interno.

Vale ressaltar que estas fortes evidências do envolvimento da IL-6 com PAIR têm sido verificadas por meio de vários estudos em modelos animais.¹¹⁻¹⁴ Evidências em humanos em relação às interleucinas pró-inflamatórias e PAIR foram relatadas recentemente por nosso grupo, que investigou a associação do polimorfismo no gene da IL-1 β com a PAIR.³⁰ Este estudo demonstrou que o polimorfismo neste gene não está associado à PAIR nos idosos avaliados. Entretanto, os achados do presente estudo mostraram que o polimorfismo no gene da IL-6 deve contribuir para o risco de ocorrência da PAIR em idosos brasileiros.

Considerando este contexto, a determinação do polimorfismo no gene da IL-6 em pacientes com perda auditiva relacionada à história de exposição ocupacional ao ruído pode nos ajudar a compreender a variabilidade individual da inflamação, resultando na perda auditiva, assim como, no futuro, sugerir a genotipagem de indivíduos para este polimorfismo em particular (rs1800795), a fim de determinar a suscetibilidade individual fornecendo uma nova estratégia para a prevenção da perda auditiva relacionada à exposição ao ruído.

Conclusões

Foi encontrada uma associação entre o polimorfismo no gene da IL-6 e a perda de audição associada à exposição ocupacional ao ruído em idosos brasileiros. Estudos baseados em grandes populações e com diferentes etnias deveriam ser conduzidos para confirmar nossos achados.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela FUNADESP.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Shrestha LB. Population aging in developing countries. *Health Affairs*. 2000;19:204-12.
- Kinsella K, He W. *An aging world: 2008*. Washington, USA: Census Bureau; 2009.
- Veras R. Population aging today: demands, challenges and innovations. *Rev Saude Publica*. 2009;43:548-54.
- Nudelmann AA, Costa EA, Seligman J, Ibañez RN. Perda auditiva induzida pelo ruído. Porto Alegre: Bagagem; 1997
- Keithley EM, Wang X, Barkdull GC. Tumor necrosis factor alpha can induce recruitment of inflammatory cells to the cochlea. *Otol Neurotol*. 2008;29:854-9.
- Hirose K, Discolo CM, Keasler JR, Ransohoff R. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J Comp Neurol*. 2005;489:180-94.
- Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope*. 2002;112:1627-34.
- Jokay I, Papp Z, Soos G, Sziklai I, Dezso B. The effect of chronic otitis media on the immunoreactivity of human inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2001;258:529-32.
- Okano T, Nakagawa T, Kita T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, et al. Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *J Neurosci Res*. 2008;86:1758-67.
- Tan BT, Lee MM, Ruan R. Bone marrow-derived cells that home to acoustic deafened cochlea preserved their hematopoietic identity. *J Comp Neurol*. 2008;509:167-79.
- Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res*. 2006;83:575-83.
- So H, Kim H, Lee JH, Park C, Kim Y, Kim E, et al. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NFkappa. *B J Assoc Res*. 2007;8:338-55.
- Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano H J, Shibata S, Yamashita D, et al. Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neuroscience Res*. 2010;66:345-52.
- Nakamoto T, Mikuriya T, Sugahara K, Hirose Y, Hashimoto T, Shimogori H, et al. Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. *Auris Nasus Larynx*. 2012;39:270-4.
- Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2003;4:139-47.
- Dinarelo CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117:3720-32.
- Hwang JH, Chen JC, Yang SY, Wang MF, Chan YC. Expression of tumor necrosis factor-a and interleukin-1b genes in the cochlea and inferior colliculus in salicylate-induced tinnitus. *J Neuroinflammation*. 2011;8:30.
- Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol*. 1998;47:195-8.
- Bioque G, Crusius JB, Koutroubakis I, Bouma G, Kostense PJ, Meuwissen SG, et al. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 1995;102:379-83.

20. Costa AM, Guimarães MCM, De Souza ER, Nóbrega OT, Bezerra ACB. Interleukin-6 (G-174C) and tumour necrosis factor-alpha (G-308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis. *Gerodontol.* 2010;27:70-5.
21. Raosoft Sample Size Calculator [site da Internet; acessado 10 Jun 2013] Disponível em: <http://www.raosoft.com/samplesize.html>
22. Spirduso WW. *Physical dimensions of aging.* 2ª ed. Barueri: Manole; 2005. p. 75-80.
23. National Committee on Noise and Hearing Conservation. Recommendations for the assessment of damage caused by noise induced hearing loss. Letter to the editors. *Acta AWHO.* 1996;16:45.
24. Amorim RB, Lopes AC, Santos KT, Melo AD, Lauris JR. Hearing alterations in the occupational exposure in musicians. *Arch Otorinolaryngol Int.* 2008;12:377-83.
25. Manual de Procedimentos em Audiometria Tonal Limiar, Logoaudiometria e Medidas de Imitação Acústica [acessado 18 Abr 2013]. Disponível em: <http://www.fonoaudiologia.org.br/publicacoes/ManualdeAudiologia.pdf>
26. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens;* 1992;39:225-35.
27. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel N1aIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet.* 1998; 25:267.
28. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, De Brito RB Jr, De Souza AP, Line SRP. Polymorphism at the position -174 of IL-6 is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003;30: 438-42.
29. Fishman D, Faulds G, Jeffrey R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Investigation.* 1998;102:1369-76.
30. Carvalho LCL, Marchiori LM, Melo JJ, Maciel SM, Poli-Frederico RC. Interleukin-1b gene polymorphism and hearing loss related to the history of occupational noise exposure in Brazilian elderly. *Noise Health.* 2013;15:160-4.