



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<sup>a</sup>, Sandra Mara Maciel<sup>b,c</sup>, Luciana Lozza de Moraes Marchiori<sup>a,d,\*</sup>,  
Regina Célia Poli-Frederico<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR, Brasil

<sup>b</sup> University of London, Londres, Reino Unido

<sup>c</sup> Departamento de Odontologia Pediátrica, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

<sup>d</sup> Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

<sup>e</sup> 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).

**PALAVRAS-CHAVE**

Ruído ocupacional;  
Perda auditiva  
neurosensorial;  
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 significante 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.<sup>1</sup> Estima-se que até 2040 os países em desenvolvimento tenham um bilhão de pessoas com 60 anos ou mais.<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup>

Os tipos mais comuns de perda auditiva são a presbiacusia (envelhecimento) e a perda auditiva induzida por ruído<sup>4</sup> (PAIR). A PAIR se deve à exposição contínua a níveis intensos de ruídos, resultando em diminuição gradual da acuidade auditiva, geralmente sendo bilateral, simétrica, neurosensorial e irreversível. Comumente manifesta-se nas altas frequências audiométricas de 3.000 a 6.000 Hz.<sup>5</sup> 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.<sup>5-7</sup> A existência de células inflamatórias no estado estacionário e seu aumento após lesões no ouvido interno têm sido relatados por vários pesquisadores.<sup>6,8-10</sup>

A exposição ao ruído induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6<sup>11</sup> (IL-6). So et al.<sup>12</sup> observaram uma *up*-regulação transitória de IL-6 em modelos animais tratados com cisplatina. Wakabayashi et al.<sup>13</sup> 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.<sup>14</sup> 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,<sup>15</sup> e vários estudos têm investigado polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) como fatores de risco para doenças inflamatórias.<sup>16</sup> Estes SNPs podem afetar a expressão, secreção e transporte celular das interleucinas,<sup>17,18</sup> 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 $\beta$ .<sup>19</sup>

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.<sup>20</sup>

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%.<sup>21</sup> 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.<sup>22</sup> 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.<sup>23-25</sup>

### 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.<sup>26</sup>

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 MgCl<sub>2</sub>, 8 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos, 1 uM de cada um dos iniciadores e 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA). Os iniciadores utilizados foram: F-5'TTG TCAAGA CAT GCC AAG TGC T-3' e R-5'GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-3'<sup>27</sup> (*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		
<i>Sem história de exposição ao ruído</i>		
Sem perda auditiva	17	8,9
Com perda auditiva	113	59,2
<i>Com história de exposição ao ruído</i>		
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.<sup>15</sup> A funcionalidade de SNPs, no que diz respeito à expressão do gene, é um assunto importante em estudos de associação a doenças.<sup>16</sup>

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%.<sup>28</sup> 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.<sup>20,28</sup>

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.<sup>29</sup> 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 <sup>a</sup>
	GG	09 (52,9)	62 (54,9)	
	CC	01 (05,9)	08 (07,0)	
	GC	07 (41,2)	43 (38,1)	0,8696 <sup>b</sup>
	Frequência alélica			
	G	25 (73,5)	167 (76,9)	
	C	09 (26,5)	59 (23,1)	
Com histórico	Frequência genotípica			< 0,01 <sup>c</sup>
	GG	03 (12,0)	33 (91,7)	
	CC	04 (16,0)	02 (05,5)	
	GC	18 (72,0)	01 (02,8)	< 0,01 <sup>d</sup>
	Frequência alélica			
	G	24 (48,0)	67 (93,0)	
	C	26 (52,0)	05 (07,0)	

<sup>a</sup>  $\chi^2 = 0,078$ .

<sup>b</sup>  $\chi^2 = 0,027$ .

<sup>c</sup>  $\chi^2 = 40,201$ .

<sup>d</sup>  $\chi^2 = 31,605$ .

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

Os estudos de Hirose et al.<sup>6</sup> e Fujioka et al.<sup>11</sup> apontaram a possibilidade de alterações inflamatórias na cóclea após o estímulo por ruído. Fujioka et al.<sup>11</sup> demonstraram pela primeira vez a indução de citocinas pró-inflamatórias na cóclea exposta ao ruído e observaram a expressão aumentada das interleucinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  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.<sup>12</sup> 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 de IL-6 apresenta um efeito protetor coclear. Wakabayashi et al.<sup>21</sup> 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.<sup>14</sup> 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.<sup>11-14</sup> 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 $\beta$  com a PAIR.<sup>30</sup> 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 NlaIII 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.