



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

LUIZ CARLOS LUCIO CARVALHO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DA
INTERLEUCINA 1B E A PERDA AUDITIVA ASSOCIADA AO HISTÓRICO DE
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO RUÍDO.**

Londrina
2012

LUIZ CARLOS LUCIO CARVALHO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DA
INTERLEUCINA 1B E A PERDA AUDITIVA ASSOCIADA AO HISTÓRICO DE
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO RUÍDO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Célia Poli-Frederico

Londrina
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação

Carvalho, Luiz Carlos Lucio.

V234e Estudo de associação entre o polimorfismo no gene da interleucina-1 β e a perda auditiva associada ao histórico de exposição ocupacional ao ruído/ Luiz Carlos Lucio Carvalho. Londrina : [s.n], 2012. 40 fls.

Dissertação (Mestrado) – Ciências da Reabilitação. Universidade Norte do Paraná.
Orientador: Prof^a Dr^a Regina Célia Poli-Fredrico.

1- Ciências da Reabilitação - dissertação de mestrado - UNOPAR 2- Perda auditiva
3- Histórico de exposição ao ruído ocupacional 4- Interleucina-1 β 5- Idosos
I- Poli-Fredrico, Regina Célia, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 616.314-089.27/.28

LUIZ CARLOS LUCIO CARVALHO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DA
INTERLEUCINA 1B E A PERDA AUDITIVA ASSOCIADA AO HISTÓRICO DE
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO RUÍDO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina [UEL] e Universidade Norte do Paraná [UNOPAR]), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

BANCA EXAMINADORA

Dra Regina Célia Poli-Frederico
Prof^a Orientadora
Universidade Norte do Paraná

Dra Luciana L.M. Marchiori
Prof^a Componente da Banca
Universidade Norte do Paraná

Dra Roberta Losi Guembarovski
Prof^a Componente da Banca
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 24de Fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho minha família, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos. Ao Dr Nelson Bueno, que guiou meus primeiros passos no mundo acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra Regina Célia Poli-Frederico, pela atenção, dedicação, perseverança e principalmente pela sua amizade.

Aos professores que compuseram o corpo docente do programa que com muito esmero lapidaram nossa formação, em especial ao Dr Jeferson Cardoso, Dra Vanessa Probst, Dra Karen Parron e Dr Fábio Pitta.

Aos amigos, Vinicius Arantes Coelho e Dênis Santos, que sempre auxiliaram e compartilharam tanto as alegrias quanto as dificuldades desta jornada.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

CARVALHO, Luiz Carlos Lucio. **Estudo de associação entre o polimorfismo no gene da interleucina-1 β e a perda auditiva associada ao histórico de exposição ocupacional ao ruído.** 2012. 43 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade Norte do Paraná, Londrina.

RESUMO

Introdução. A perda auditiva é a alteração sensorial mais comum em pessoas idosas e pode apresentar consequências sociais e psicológicas, tais como isolamento social, frustração e depressão. A perda auditiva induzida por ruído (PAIR) é uma interação de ambos os elementos genéticos e ambientais. Alguns estudos têm conduzido à possível identificação de genes de suscetibilidade a PAIR. **Objetivo.** Investigar se o polimorfismo do gene da *IL-1 β* na posição +3954 está associado a perda auditiva devido a exposição ocupacional ao ruído. **Métodos.** Foi estudada uma amostra populacional composta por idosos (idade \geq 60 anos) com perda auditiva com (99) e sem (193) história de exposição ao ruído ocupacional e 71 idosos saudáveis. A exposição ocupacional ao ruído foi obtida por meio da aplicação de um questionário semi-estruturado. A acuidade auditiva mensurada foi de 500 a 6000 Hz e o genótipo da *IL-1 β* foi obtido por meio da técnica de PCR-RFLP. Diferenças nas distribuições alélicas e genotípicas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado, assim como para verificar a associação entre as frequências genotípicas e a perda auditiva associada ao histórico de exposição ocupacional ao ruído. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. **Resultados.** 50,1% dos idosos eram homozigotos para o alelo ancestral (C), 17,1% homozigotos para o alelo polimórfico (T) e 32,8% eram heterozigotos (CT). A frequência alélica encontrada foi de 66% para o alelo C e 34% para o alelo T. **Conclusão.** Não houve associação significativa entre o polimorfismo no gene *IL-1 β* e a perda auditiva relacionada ao histórico de exposição ocupacional.

Palavras-chave: Perda auditiva-Ruído-Interleucina1 β -Idosos -Polimorfismo genético

CARVALHO, Luiz Carlos Lucio. **Association study between the Interleukin-1 β gene and hearing loss associated to the history of occupational noise exposure.** 2012. 43 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade Norte do Paraná, Londrina

ABSTRACT

Background. Hearing loss is the most common sensory impairment in older people and may have social and psychological consequences, such as social isolation, frustration and depression. The noise-induced hearing loss (NIHL) is an interaction of both genetic and environmental factors. Some studies have led to identification of possible NIHL susceptibility genes. **Aim.** To investigate whether the polymorphism of IL-1 β gene at position+3954 was associated with complaints of hearing loss due to occupational exposure. **Methods.** The sample population comprised of elderly (age \geq 60 years) with hearing loss (99), and without history of occupational noise exposure (193), and 71 healthy elderly subjects. Occupational exposure to noise was achieved by applying a semi-structured questionnaire. The hearing acuity was measured from 500 to 6000 Hz and the genotype of the IL-1 β was obtained by PCR-RFLP. Differences in allelic and genotypic frequencies were analyzed by chi-square, as well as to assess the association between genotype frequencies and hearing loss associated with occupational exposure to noise. The level of significance was $p \leq 0.05$. **Results.** 50.1% of the subjects were homozygous for the ancestral allele (C), 17.1% homozygous for the polymorphic allele (T) and 32.8% were heterozygous (CT). The allele frequency was found to be 66% for allele C and 34% for allele T. **Conclusion.** There was no significant association between the polymorphic gene IL-1 β and hearing loss related to occupational exposure.

Key words: Hearing Loss – Noise – Interleukin1 β – Elderly – Genetic polymorphism

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 CONTEXTUALIZAÇÃO | |
| 2.1 O envelhecimento | 14 |
| 2.2 A perda auditiva | 15 |
| 2.3 O polimorfismo genético da Interleucina-1 β | 18 |
| 3 ARTIGO: | 21 |
| CONCLUSÃO GERAL | 36 |
| REFERÊNCIAS | 37 |
| ANEXOS | 43 |
| ANEXO A – Normas de formatação do periódico | 44 |
| ANEXO B – Parecer do comitê de Bioética..... | 55 |

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população mundial está aumentando, especialmente nos países em desenvolvimento (1). O número de brasileiros com idade superior a 60 anos aumentou de dois milhões em 1950 para 15,4 milhões em 2002, um aumento de 700% (2). Projeta-se que em 2025 o Brasil terá a sexta maior população de idosos do mundo, correspondendo a 30 milhões de idosos (15% da população brasileira) (3).

A perda auditiva é a alteração sensorial mais comum em idosos (4) e pode levar à depressão, isolamento social e frustração (5). A etiologia da perda auditiva é bem diversificada, podendo ser causada pelo processo de envelhecimento, traumatismos, exposição extraocupacional ao ruído, tabagismo, doenças sistêmicas, exposição a agentes químicos e ruídos ocupacionais (6).

Com o aumento da longevidade a incidência de doenças crônicas também aumenta, comprometendo a qualidade de vida de pacientes idosos com tais alterações. Um estudo realizado em São Paulo - Brasil por Lima et al. (7) revelou que 70% da população acima de 60 anos de idade têm pelo menos uma doença crônica degenerativa, e destes 25% têm três ou mais dessas manifestações. O mesmo estudo indicou o acidente vascular cerebral, depressão e ansiedade como fatores que afetam a qualidade de vida do idoso.

As perdas auditivas mais comuns são a presbiacusia (decorrente do processo de envelhecimento) e a Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR), ocorrendo geralmente a partir de exposição ocupacional ao ruído (7). A PAIR é irreversível e pode ter vários sintomas como queixa de perda auditiva, zumbido, vertigem, diminuição gradual ou distorção na compreensão da fala (8). Vale ressaltar que há poucos estudos sobre a prevalência da perda auditiva em adultos e idosos brasileiros (6). Arakawa et al (7), analisaram diversos estudos e observaram uma variação entre 15,9% e 54% na prevalência de PAIR em adultos. Já em idosos a média é de 11,6%, sendo que em idades superiores a 80 anos, esta prevalência é de 14,6% (6).

A PAIR é associada à exposição excessiva a sons intensos, mas, também apresenta uma suscetibilidade genética (7) e recentemente, a indução de resposta inflamatória e aumento da regulação de citocinas pró-inflamatórias na orelha interna têm sido relatados quando realizada experimentalmente a estimulação a ruídos nocivos (9). A estrutura e expressão de citocinas pode ser influenciada pela variação genética, resultando em condições patogênicas (10). Dinarello (11) verificou que diversos estudos associaram o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs) como fator de risco para doenças inflamatórias.

Dentre as citocinas, a Interleucina-1 (IL-1) tem papel chave na fase inflamatória aguda e nos processos de apoptose (12). A produção e a atividade biológica desta citocina são rigorosamente controladas em condições normais, sendo um dos principais fatores desta condição, o receptor antagonista da IL-1 (IL-1Ra) que atua de forma competitiva, ligando-se aos receptores de IL-1 (13).

A família da interleucina -1 é composta pela interleucina-1 α (*IL-1 α*) e interleucina -1 β (*IL-1 β*). A forma predominante é a *IL-1 β* , sendo secretada por macrófagos, monócitos, células dendríticas, células *natural killer* e Células B (14). O gene que codifica a *IL-1 β* possui 1498 pares de base contendo dois polimorfismos principais situados nas posições - 511 e + 3954 (15).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se o polimorfismo do gene da *IL-1 β* na posição +3954 (rs1143634) está associado a queixa de perda auditiva devido a exposição ocupacional.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 O Envelhecimento

A população idosa aumenta de forma global, contudo existem diferentes ritmos de crescimento de acordo com as especificidades dos países envolvidos. Projeções recentes de países desenvolvidos sugerem que, caso se mantenha as taxas atuais, a maioria das crianças européias nascidas neste século atingirão os 100 anos de vida ou mais (5).

No Brasil este aumento da expectativa de vida ocorreu de forma muito veloz, resultando em uma sociedade despreparada para adaptar-se a um novo contexto (2). O número de idosos aumentou de 2 milhões em 1950 para 15,4 milhões em 2002, resultando em um aumento de 700% (2). Estudos estimam que a população de idosos no Brasil, em 2025, será de aproximadamente 30 milhões de pessoas (1).

Com relação à expectativa de vida do brasileiro, esta aumentou consideravelmente no século XX. No início do século a expectativa de vida era de 33,7 anos. Na década de 50 esta marca era de 43,2 anos, evoluindo para 56 anos na década de 60, 65 anos na década de 80 e 70 anos em 2000. Em 2006 a média de idade chegou a 72 anos e em 2010 a expectativa média de vida é de aproximadamente 75 anos (16). A sobrevivência das mulheres ainda é maior, cerca de 80 anos contra 70 anos para os homens. Quando se compara o aumento da expectativa de vida no último século, as mulheres tiveram um aumento de 35,7% e os homens de 28,9% (16).

Com o acréscimo da longevidade, a incidência de doenças crônico-degenerativas também se eleva, comprometendo a qualidade de vida dos idosos portadores de tais acometimentos. Um estudo realizado no estado de São Paulo por Lima et al. (4) detectou que 70% da população acima dos 60 anos de idade possui pelo menos uma doença crônico-degenerativa e, destes, 25% apresentam três ou mais destas manifestações. O mesmo estudo apontou o acidente vascular encefálico, a depressão e a ansiedade como os fatores que mais afetam a qualidade de vida dos idosos. Entretanto, a perda auditiva, doença sensorial de maior incidência em idosos (5), por muitas vezes é negligenciada por ser associada como um processo natural de envelhecimento do organismo (6).

2.2 A Perda auditiva

Atualmente, nos Estados Unidos, 28 milhões de indivíduos possuem algum tipo de perda auditiva, sendo esta em 80% dos casos irreversível (17). Em relação aos idosos brasileiros, a taxa de perda auditiva é de aproximadamente 54%. Contudo, os estudos

realizados são contraditórios, tendo uma variação de prevalência, mesmo quando os mesmos são conduzidos em regiões semelhantes (7).

As alterações auditivas adquiridas são mais comuns, destacando-se a presbiacusia e a perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) (18). A presbiacusia ocorre paralela ao processo de envelhecimento, caracterizando-se por perda auditiva neurosensorial, bilateral, gradual e progressiva, podendo ou não apresentar zumbido associado (18). 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 (19).

A perda auditiva reduz consideravelmente a qualidade de vida dos idosos, sendo associada à demência (20), dificuldade em dirigir (21), dificuldade de locomoção (22), perda de capacidade cognitiva (23), declínio funcional (24), quedas (21), depressão, frustração e isolamento social (25).

Uma possível explicação é a dificuldade de comunicação gerar uma sobrecarga neural no processo de decodificação das informações auditivas, resultando em uma menor disponibilidade cognitiva para a realização de outras tarefas, culminando em um isolamento social progressivo, declínio da saúde e repercutindo em consequências funcionais (23, 26).

A etiologia da perda auditiva possui componentes ambientais e genéticos. Dentre os fatores ambientais pode ser destacado principalmente o tabagismo, etilismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus e drogas ototóxicas, somando-se a estes a exposição a altos níveis de ruído (27).

O papel dos fatores genéticos na PAIR é confirmado por muitos estudos em animais, entretanto, estudos de herdabilidade para PAIR em humanos ainda não têm sido muito realizados. Huyghe et al. (28) relataram resultados de um estudo transversal de base genética familiar de PAIR empregando dados audiométricos. Os autores estudaram 1.126 indivíduos de ascendência europeia a partir de 204 proles em 9 centros localizados em sete países europeus. Dados fenotípicos foram disponíveis para 955 pacientes, 430 homens e 525 mulheres com idade média de 61 anos (variando entre 49 a 76 anos de idade). Indivíduos com problemas médicos ou doenças que poderiam afetar a capacidade de audição foram excluídos. Os limiares auditivos foram corrigidos para a idade e gênero. Esses pesquisadores realizaram uma associação ampla do genoma, bem como a ligação com microarranjos de alta densidade de SNP. Nenhuma associação foi detectada. No entanto, um pico de ligação genética no cromossomo 8 foi identificado, mais especificamente no gene WYHD1 (proteína N-terminal glutamina amido-hidrolase), sendo que este é responsável por sintetizar enzimas que reduzem

a degradação proteica. A região que atingiu significância no cromossomo 8, mediu cerca de 7 Mb, aproximadamente entre os SNPs rs3765212 e rs4601326, correspondendo a região 8q24.13-q24.22.

Van Laer et al. (29) avaliaram polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em 70 genes candidatos a perda auditiva em 2.318 pacientes com deficiência auditiva relacionada à idade provenientes de nove centros de pesquisa em sete países europeus. Uma associação significativa foi encontrada com rs10955255 no íntron1 do gene *GRHL2* no cromossomo 8q22. Este gene codifica proteínas atuantes no processo de adesão celular, sendo que seu polimorfismo resulta em formação de cistos, má formação do canal semicircular e dessensibilização aos estímulos sonoros.

Já que a exposição excessiva ao ruído de alta intensidade é uma causa conhecida de perda auditiva neurossensorial, clínica e experimental, os pesquisadores concentraram suas atenções na patologia de células ciliadas em perda auditiva induzida por ruído, devido à excessiva estimulação destas células. No entanto, estudos recentes mostraram o envolvimento de células não-sensoriais (30), sugerindo que uma resposta alternativa fisiopatológica e /ou fisiológica ao ruído sobre-estimulação, também podem estar envolvidas na PAIR.

Previamente, a orelha interna era considerada um órgão imuno-privilegiado isolado pela barreira hemato-labiríntica (31), similar à barreira hemato-encefálica do sistema nervoso central (SNC) e da barreira hemato-ocular da córnea e retina do olho. Recentemente, a indução de respostas inflamatórias e *up*-regulação de citocinas pró-inflamatórias da orelha interna têm sido relatadas em várias condições prejudiciais incluindo o excesso de estímulo pelo ruído (9,32-34). A existência de células inflamatórias no estado estacionário e seu aumento após lesões à orelha interna têm sido referida por vários grupos (32, 35-37).

Uma explicação para o dano secundário seria o local de *up*-regulação das citocinas pró-inflamatórias, pois estas moléculas são endogenamente elevadas em estágios iniciais da cóclea danificada (prazo de 1 dia) e geralmente induzem infiltração de células inflamatórias, onde os aumentos são efetivamente observados na cóclea até um nível máximo em 3-7 dias após a lesão. De fato, uma das citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), induz o recrutamento de células pró-inflamatórias dentro da cóclea (9), e a supressão da infiltração dessas células, pela inibição do TNF- α , reduz o sinal de perda auditiva em modelo animal de labirintite imunomediada induzida pela imunização com hemocianina (34, 38).

O envolvimento da IL-6 em danos à orelha interna também tem sido previamente demonstrado. Soet al. (39) observaram uma *up*-regulação transitória de IL-6 em modelos animais tratados com cisplatina. Este tratamento assemelha-se a um dano à cóclea produzida por um ruído exacerbado. Estes achados mostram claramente que IL-6 atua como um indutor de lesão coclear aguda. Portanto, a inibição da IL-6 pode melhorar a deficiência auditiva, o que pode ser um benefício clínico. Diante deste contexto, Wakabayashiet al. (40) investigaram o efeito da inibição da IL-6 usando um anticorpo anti-IL-6 (MR16-1) em camundongos. Assim, o MR16-1 apresentou efeito protetor funcional e patológico para a lesão coclear induzida pelo ruído, principalmente devido à supressão da perda neuronal e, presumivelmente, através do alívio da resposta inflamatória. A terapia com citocinas anti-inflamatórias, incluindo o bloqueio de IL-6, seria uma nova estratégia viável para o tratamento de perda auditiva neurossensorial aguda, relataram os autores.

Concomitantemente, estudos experimentais sobre a inflamação do ouvido interno têm mostrado em pesquisas *in vivo* a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 na cóclea, juntamente com a infiltração leucocitária; ambos os processos foram aumentados por injeções intraperitoneais de polilipossacarídeo (LPS) em modelos animais (34, 41). Estes relatos indicam o envolvimento das pró-citocinas na lesão coclear.

A função dos fatores genéticos na PAIR é confirmada por muitos estudos em animais. Por exemplo, linhagens de camundongos que exibem perdas auditivas relacionadas à idade são mais suscetíveis ao ruído do que outras linhagens de camundongos (42, 43, 44). Além disso, vários camundongos *knock-out*, como PMCA2 / -, CDH23 + / (45), foram mais suscetíveis ao ruído do que os animais do tipo selvagem da mesma ninhada.

Desde o desenvolvimento de tecnologias de genotipagem e do conhecimento dos SNPs e suas características no genoma humano, conforme estabelecido pelo projeto HapMap (www.hapmap.org), todos os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) estão sendo cada vez mais utilizados para identificar genes de suscetibilidade envolvidos em doenças complexas, tais como a PAIR. Portanto, uma abordagem para identificar genes de suscetibilidade em humanos é relevante. A procura por genes candidatos de suscetibilidade está sendo realizada avaliando vários genes de estresse oxidativo (*GSTM1*, *GSTT1*, *PON1*, *PON2*, *SOD2*, *SGPC*, *CAT*, *SOD*, *GPX1* e *GSR*) (46-49) e genes das vias de K-reciclagem (*GJB1*, *GJB2*, *GJB3*, *GJB4*, *GJB6*, *KCNJ10*, *KCNQ1*, *KCNQ4*, *KCNE1* e *SLC12A2*) (50-52). Dois destes estudos falharam em detectar associações significativas com PAIR (50, 51). Outros estudos de associação identificaram os genes *KCNE1* (52), *GSTM1* (46) e *CAT* (49) como possíveis genes de suscetibilidade à PAIR.

Liu et al. (53) investigaram se os SNPs no gene da superóxido dismutase-Mn (*SOD2*) estão relacionados à suscetibilidade à PAIR. Sugeriram que o SNP em *SOD2- VI6A* está associado a PAIR em trabalhadores chineses, e seu efeito foi aumentado pelo nível de exposição à ruídos.

Uma associação significativa foi encontrada entre PAIR e haplótipos compostos por três polimorfismos localizados no gene *HSP70* (rs1043618, rs1061581 e rs2227956) em uma população chinesa de trabalhadores de indústrias automotivas (54). As proteínas de estresse (*Heat Shock Proteins- HSP*) são responsáveis pela adaptação celular a estímulos externos, atuando na homeostasia celular.

Um estudo desenvolvido por Saiko et al. (55) mostrou uma associação significativa entre o polimorfismo no gene *UCP2 – A55V* (proteína desacopladora mitocondrial) com a perda auditiva relacionada a idade em uma população do Japão. Um total de 1.547 indivíduos com idades entre 40-79 anos e residentes em Aichi, no Japão, foram inseridos neste estudo. Os indivíduos foram acompanhados a cada 2 anos, e o número total de indivíduos avaliados em 3 exames sequenciais por seis anos foi de 4.942 pessoas. Questionários detalhados, medições de audiometria tonal e polimorfismos em *UCP1 A-3826G* e *UCP2 Ala55Val* foram examinados. As associações entre perda auditiva e os polimorfismos dos genes da *UCP1* e *UCP2* com a idade, sexo, história de exposição ocupacional ao ruído e índice de massa corporal foram analisados. Polimorfismo em *UCP1 A-3826G* não apresentou associação significativa com perda auditiva. No entanto, o polimorfismo *Ala55Val UCP2* apresentou uma associação significativa com a perda auditiva em todos os modelos de herança: dominante ($p = 0,0167$), recessiva ($p = 0,0411$) e aditiva ($p = 0,0061$).

Konings et al (49) estudaram 644 polimorfismos em 54 genes (população polonesa) verificando se havia uma maior suscetibilidade a PAIR e verificaram uma associação positiva entre os polimorfismos rs667907 e rs588035 do gene *MYH14* (myosin, heavy chain 14) e o rs7095441 do gene *PCDH15* (protocadherin). O primeiro codifica uma das proteínas da grande família da miosina, sendo que seu polimorfismo altera a motilidade e polaridade celular, resultando em perda auditiva. Já o segundo codifica uma proteína que media a adesão celular cálcio-dependente, tendo um papel fundamental na homeostasia da cóclea.

Entretanto, para desenvolver-se biomarcadores moleculares é interessante utilizar genes que possam atuar em diversos processos patogênicos, e neste sentido destacam-se as citocinas, pois estudos demonstraram a indução de lesões cocleares mediante respostas inflamatórias oriundas de exposição a altos níveis de ruído (32).

2.3 Polimorfismo genético da Interleucina 1 β

Durante o processo de envelhecimento, ocorrem fenômenos complexos que submetem o organismo a inúmeras alterações anatômicas, fisiológicas e psicossomáticas (56). Dentre os órgãos e sistemas do organismo humano que sofrem essas alterações, o sistema imunitário é um dos mais atingidos no envelhecimento, sofrendo modificações nas subpopulações celulares, na tolerância imunológica, nos padrões de secreção de citocinas, entre outras funções (57).

O sistema imunológico é composto por proteínas responsáveis pela mediação das respostas imunológicas, tornando-as mais eficazes. Estas são denominadas citocinas, proteínas reguladoras, de baixo peso molecular, produzidas por diferentes tipos celulares e que agem de maneira autócrina, parácrina e endócrina em resposta a inúmeros estímulos. Interagem com as células através de receptores específicos de alta afinidade, e exercem suas funções em concentrações baixas. As citocinas regulam a intensidade e a duração da resposta imunológica por meio da estimulação ou da inibição da ativação, proliferação e/ou diferenciação de várias células e através da regulação da secreção dos anticorpos ou outras citocinas (58).

As citocinas apresentam características relevantes como pleiotropia (uma única citocina exercendo diferentes efeitos biológicos em diferentes tecidos celulares), redundância (duas ou mais citocinas que desempenham as mesmas funções), sinergismo (efeito combinado de duas ou mais citocinas é maior do que as ações somadas das citocinas individuais), antagonismo (efeitos de uma citocina inibem ou compensam efeitos de outra citocina), indução em cascata (ações de determinada citocina em suas células-alvo estimula a produção de outras citocinas) permitindo que regulem a atividade celular e a resposta imunológica de forma coordenada e interativa (57).

As citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), participam da resposta inflamatória através de reações em cascata, pelo estímulo ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A secreção de hormônio glicocorticóide pela adrenal em situações de estresse inibe o processo inflamatório e a produção de citocinas, por um mecanismo auto limitado de retroalimentação neuroendócrina e imune (58).

A interleucina-1 inclui duas proteínas distintas: a IL-1 α e a IL-1 β . A IL-1 β é sintetizada como pró IL-1 β (proteína precursora) de 31 KDa contendo 269 aminoácidos que é clivada por uma enzima conversora produzindo a IL-1 β madura de 17 KDa contendo 153 aminoácidos (58).

A IL-1 β é produzida, de maneira primária, por monócitos e macrófagos, mas também por células nervosas da glia e neurônios, células adrenais e endoteliais, plaquetas, linfócitos T, neutrófilos, osteoblastos e fibroblastos (60, 61). Esta interleucina tem como função iniciar o processo inflamatório e a sua liberação pode ser induzida também pela presença de endotoxinas bacterianas ou substâncias inflamatórias não microbianas (58, 62). A IL-1 β induz secreção de quimiotáticos pelas células do endotélio capilar e aumenta a expressão de moléculas de adesão celular facilitando o recrutamento de mononucleares e estimulando a secreção de interferon gama e a ativação de macrófagos (59).

Há vários relatos na literatura mostrando a relação entre polimorfismos no gene da IL-1 β e doenças envolvidas no processo do envelhecimento. A expressão da IL-1 β tem sido descrita em tecido tumoral da mama (63), assim como em outros tecidos tumorais (64, 65). Estudos *in vivo* demonstraram o envolvimento crucial na sobrevivência e proliferação celular e angiogênese (64). Recentes pesquisas sugerem que a IL-1 está associada a formas mais agressivas de câncer de mama (65, 66).

Existem dois principais polimorfismos da *IL-1 β* , ambos são substituição de uma base C por uma base T, sendo um localizado na posição - 511 e a outro na posição + 3954. Estes polimorfismos aumentam a atividade transcricional dos genes (67).

Paralelamente estudos experimentais a respeito da inflamação da orelha interna verificaram a produção *in vivo* de IL-1 β , IL-6 e TNF- α associada a infiltração de leucócitos na cóclea (32), sendo que Satoh et al (68) verificaram a associação do TNF- α com a deterioração da cóclea, resultando em perda auditiva. Contudo os mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos e as pesquisas muitas vezes apresentam resultados contraditórios com relação a participação efetiva das citocinas neste processo(67).

Este crescimento na compreensão do papel da variação genética na inflamação e nas doenças crônicas fornece oportunidades para identificar pessoas saudáveis que apresentam risco aumentado de doença e potencialmente modificar a trajetória da morbidade, prolongando a longevidade e possibilitando um envelhecimento saudável (69).

Noise and Health

Interleukin-1 β gene polymorphism and hearing loss related to the history of occupational noise exposure in Brazilian elderly

Luiz C. L. Carvalho¹, Juliana J. Melo², Luciana L. M. Marchiori² and Regina C. Poli-Frederico¹

¹Department of Rehabilitation Sciences, Universidade Norte do Paraná, Londrina, Brazil

²Department of Audiology and Speech Therapy, Universidade Norte do Paraná, Londrina, Brazil

Address correspondence to Regina C. Poli-Frederico, PhD. Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675 – Londrina, Pr. Brazil

Email: reginafrederico@yahoo.com.br

Abstract

Hearing loss is the most common sensory impairment in older people and may have social and psychological consequences, such as social isolation, frustration and depression. The noise-induced hearing loss (NIHL) is an interaction of both genetic and environmental factors. Some studies have led to identification of possible NIHL susceptibility genes. To investigate whether the polymorphism of *IL-1 β* gene at position +3954 was associated with complaints of hearing loss due to occupational exposure. The sample was composed of 99 elderly (age \geq 60 years) with hearing loss with and 193 without occupational noise exposure and 95 health control subjects. Occupational exposure to noise was obtained through a semi-structured questionnaire. The hearing acuity was measured from 500 to 6000 Hz and the *IL-1 β* genotype was obtained by PCR-RFLP technique. Differences in allelic and genotypic frequencies and association between genotypic frequencies and complaints of hearing loss due to occupational exposure were analyzed by chi-square test. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. 50.1% of the elderly were homozygous for the ancestral allele (C), 17.1% were homozygous for the polymorphic allele (T) and 32.8% were heterozygous. The frequency was found to be 66% to 34% C to allele T. There was no significant association between polymorphism in gene *IL-1 β* and hearing loss associated with occupational exposure ($\chi^2 = 1.176$; $p = 0.374$). It wasn't found association with the polymorphism of the *IL-1 β +3954* C/T gene and hearing loss associated with the occupational noise exposure history.

Key-words: Hearing Loss – Noise – Interleukin1 β – Elderly – Genetic polymorphism

Introduction

The life expectancy of the world population is increasing especially in developing countries. ^[1] The number of Brazilians aged over 60 years increased from 2 million in 1950 to 15.4 million in 2002, a 700% increase. ^[2] According to World Health Organization (WHO), are considered elderly people over 65 years. This reference, however, is valid for residents of developed countries. The Brazilian Health Ministry determines that old age begins at 60 years. ^[2] It probably occurs because the Brazilian life-spectating is lower than the developed countries. ^[3]

With increasing longevity the incidence of chronic diseases also increases, compromising the life's quality of elderly patients with such affections. A study conducted in SãoPaulo – Brazil by Lima et al. ^[4] found that 70% of the population above 60 years of age or more had at least one chronic degenerative disease, and of these 25% have three or more of these manifestations. The same study indicated stroke, depression and, anxiety were the conditions that most affect quality of life among the elderly.

Hearing loss is the most widespread sensory impairment in elderly ^[5] and may lead to depression, social isolation, and frustration. ^[6] The most common hearing loss is the presbiacusis (the ageing process) and the noise-induced hearing loss (NIHL), generally occurring from occupational exposure. ^[7] The NIHL is irreversible and may have several symptoms as hearing loss complaint, tinnitus, vertigo, gradual decrease or distortion in speech comprehension. ^[8] A Brazilian study also show that hearing loss affected in about 60% of the elderly population living in Brazil ^[9] Among the adults, several studies show a range of 15.9% to 48% in the NIHL prevalence ^[7] and 11.6% in elderly being the aged over 80 years presented a prevalence of 14.6%. ^[6]

NHIL is associated with overexposure to intense sound but, it also has a genetic susceptibility ^[7] and recently the induction of inflammatory responses and up-regulation of pro-inflammatory cytokines in the inner ear has been reported in noise-over stimulation. ^[10]

The structure and expression of cytokines can be influenced by genetic variation, resulting in pathogenic conditions ^[11] and several studies have examined the single nucleotide polymorphisms (SNPs) as risk factors for inflammatory diseases. ^[12] These SNPs may affect the expression, secretion and cellular transport of the IL-1 β protein, ^{[13],[14]} also it may decrease the level of Interleukin -1 Ra, which will increase the production and activities of IL-1 β . ^[15]

Interleukin-1 is a polypeptide consisting of subtypes: IL-1 α and IL-1 β . The Interleukin-1 gene is located on the long arm of chromosome 2. ^[16] The *IL-1 β* gene consists of seven exons and six introns, and 1498 bp, responsible to encode a 269 amino acid protein. The IL-1 β is the predominant IL-1 form and is secreted mainly by macrophages, dendritic cells, monocytes, natural killer, and B cells. The *IL-1 β* gene polymorphism (+3954 C/T) may cause an increase of 4 fold in the interleukin expression, increasing the catabolism activity over the posterior anabolism and resulting in a structural deficit. ^[17] It has been associated with type 2 diabetes, osteoarthritis, post myocardial infarction heart failure, and several acute and chronic diseases. ^[12]

At least one third of patients with sudden sensorineural hearing loss had the blood-labyrinth disrupted, ^[18] increasing the permeability of the blood vessels in the inner ear, and up-regulating the pro-inflammatory cytokines. It has been observed in various damaging conditions, including noise-over stimulation. ^[10]

This study aims to evaluate the possible associations between genetic polymorphism for interleukin 1- β +3954 (rs1143634) and hearing loss related with history of occupational noise exposure.

Methods

Study area

The city of Londrina (approximately 500,000 inhabitants) is situated in the North region of the State of Paraná. The Age and Ageing Project Study (EELO) is a population based cross-sectional study of older adults which is being conducted in Londrina since 2009. In this report, we analyze data collected at the baseline of this study. The EELO cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of the UNOPAR (PP0070/09), and the present project was approved by the local Health Authorities. All participants gave informed written consent.

Study population

From a population of 43,610 elderly enrolled in the 38 Basic Health Units in Londrina's urban area, the sample was calculated in 387 subjects.^[19] The sample was randomly stratified set, considering the gender and the five regions of the city (15% of the central region of the northern 27%; 23% of the southern region; 19% of the eastern region and 16 % of the western region). For the calculation was considered a sampling error of 5%. The study included individuals aged 60 years or more, of both genders who have independent

living, which are classified in levels 3 and 4 proposed by the Spirduso.^[20] This classification evaluates the independent level of the elderly, being 1 without self-mobility and 5 athletes. It was excluded from the sample elderly who had any illness or limitation that would prevent the testing, such as physical and mental disabilities.

Each participant was required to complete a questionnaire, containing gender, age, and ethnicity.

Audiological Evaluation

The audiological evaluation was performed in a sound-proof room with an interacoustics audiometer. To determine the hearing loss severity where analyzed the means 3000, 4000 and 6000 Hz (mean II), both right and left ears.^{[21],[22]} To analyze the effect of genetic differences on the susceptibility to noise, the cases were classified into 3 groups: control (≤ 25 dB deficit) and Hearing Loss (> 25 dB deficit)^[23]

DNA extraction

Peripheral blood specimens were obtained under the consents of the examinees. The specimen was collected in a vacuum 6% EDTA tubes, and DNA was extracted using a protocol described by Olerup and Zeterquist.^[24]

From the original samples a quote was taken and diluted to 100ng/ μ L concentration. The concentration was determined by a spectrophotometer 260nm and 280nm (Biomate 3, Thermo Fischer Scientific, Madison, USA).

Genotype of *IL-1 β* polymorphism

The site C to T polymorphism, located at +3954 position in the interleukin – 1 β gene (rs1143634) was amplified resulting in a 182 bp fragment. The Polymerase Chain Reaction

(PCR) mixture contained 1X PCR buffer, 1.5 μM MgCl_2 , 8 μM each of dATP, dCTP, dTTP and dGTP, 1 μM of each sense and anti-sense primers, 2 units *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA).

The primers used were: forward 5' CTC AGG TGT CCT CGA AAG AAA TCA A 3' and reverse 5' GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG 3' (Invitrogen, Carlsbad, CA).^[25]

PCR amplification was performed in a thermal cycler (TC020A, Labnet international inc) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for five minutes, followed by 30 cycles at 95°C for 1 minute, 67°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, and a final extension step at 72°C for five minutes.

The PCR product was subject to digestion with 5 units *Taq I* (Invitrogen, Carlsbad, CA) overnight at 65°C. Digested fragments were separated on 2% agarose gels (Vivantisinc, USA) with 1X tris-Borate-EDTA (TBE) running buffer. To check the PCR conditions, the sample with known genotype was used, and as a negative control, ultra-pure water was used.

Visualization of amplifications by agarose gel electrophoresis

A 100 bp DNA ladder was included in each gel. The agarose gel was stained with 5 μl of Sybr Safe (Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, Brazil) and visualized under UV illumination. The reading and interpretation of the agarose gels was made with the LabImage L-PIX (H.E) 1D-L340 program (LoccusBiotecnologia, Brazil). The products of 85bp + 97 bp fragments (allele C), a single 182 bp fragment (allele T), and the three fragments (85 bp, 97 bp + 182 bp) in the presence of both C and T alleles were observed.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed with SPSS package versus 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Subjects characteristics were expressed as percentage and distributions of subjects (Table 1). The genotypes at +3954 C/T (rs1143634) locus were grouped as “T+” (TT and CT) and “T-“(CC) carriers. 363 elderly were classified into groups: healthy control group ($n=71$) and hearing loss with ($n=99$) and without ($n=193$) history of occupational noise exposure. The distributions of genotypes as well as frequencies of alleles for +3954 *IL-1 β* (rs1143634) polymorphism were compared between groups by Chi-square test among Brazilian elderly. Hardy-Weinberg equilibrium was tested in each group by a Chi-square test. P-value ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results

The sample was composed by 363 elderly, 34.4% male and 65.6% female gender, with mean age of 69.7 ± 6.4 years. It was observed that the majority of elderly (60.3%) were Caucasians. The prevalence of hearing loss with history of occupational noise exposure was 27.3 % (Table 1).

As show in Table 1, 50.1% of elderly were homozygotes to allele C, 17.1% were homozygotes to allele T and 32.8% were heterozygote. The C/T allele frequencies were 0.66:0.34, respectively. The distribution of *IL-1 β* alleles was within Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$).

As can be seen in Table 2, there was no significant association between the *IL-1B* +3954 genotypic frequencies and hearing loss related of history of occupational noise exposure ($\chi^2 = 1.176$; $p = 0.374$). There was also no association observed between grouped genotypes and hearing loss with or without history of occupational noise exposure ($\chi^2 = 0.849$; $p = 0.379$).

Discussion

Noise is harmful starting from 85 dBA and can lead both to mechanical and metabolic damage of the cochlea. [8],[9] Fujioka et al. [25] demonstrated that in noise-induced damaged cochlea the inflammation-related cytokines were upregulated and that the time courses of their expressions were very similar to those seen in other traumatized organs. In noise-induced damaged cochlea, the expression of proinflammatory cytokines has not yet been clarified, even though the existence of active inflammatory cells has been reported. [26] It is well established that under the same level of noise exposure, the severity of hearing impairment is not the same between different persons. This inter-individual variability might be due to an interaction between genetic, individual and environmental factors. Considering this background, determining the *IL-1 β* gene polymorphism in patients with hearing loss related of history of noise exposure may help us to understand the variability individual of inflammation in hearing loss.

In the present study, the C and T alleles frequencies were 66.5% and 33.5%, respectively. Others studies also showed the predominance of the C ancestral allele - ranging 60 – 70%. [27], [28], [29] We observed a higher frequency of CC genotype (50.1%), followed by CT (32.8%), and TT (17.1%). It is consistent with the cited previously studies. [27], [28], [29]

Proinflammatory cytokines are produced in various organ after tissue damage not only experimental immune-response models, but also in various types of insults including infection, ischemia, trauma, cryo-ablation, and burns, ^[12] by various types of cells, including residential immune-related cells (such as leukocytes, macrophages, microglia, dendritic cells), neurons and glia in the central nervous system . ^[25] As disruption of the blood-labyrinth barrier is associated with increased permeability of blood vessels in inner ear, inflammation may be related to the etiology of these inner ear diseases. ^[10]

The studies from Fujioka et al ^[25] and Hirose et al ^[26] have pointed out the possibility of inflammatory changes in noise overstimulated cochleae. Interestingly, Fujioka et al. ^[25] observed the expression and relative induction of *IL-1 β* and *TNF- α* before *IL-6* RNA expression after noise exposure.

Although the mechanism and function of these cytokines in NIHL are still obscure, it is known that the structure and expression of a cytokine can be influenced by genetic variation, resulting in evident pathologic consequences. ^[11] Functionality of SNPs with regard to gene expression is an important subject in disease-association studies and are associated with avoiding disease in late life, or their frequency has been shown to differ between younger and older individuals. ^[28]

The noise exposure induce the production of *IL-1 β* , *IL-6* and *TNF- α* by the cochlear structure, initiating an inflammatory response, and damaging itself. ^[29] The higher levels of interleukin production also upregulates the mucin secretion in the middle ear and contributes to the otitis media (middle ear inflammation). ^[30] Studies with animals confirms the higher expression of the interleukin-1 β genes correlated with hearing loss and the tinnitus

(perception of sound in the absence of acoustic stimulation), it may affect the NMDA (*N-methyl-D-aspartate*)receptors, but the exact mechanism is still unclear. ^{[31], [32]}

In the present study, we did not observed an association between the polymorphic genotype of *IL-1 β* (rs1143634) and hearing loss associated with history of occupational noise exposure. Although, the interleukin *I α* gene polymorphism (-889 C/T) has been associated with sudden sensorineural hearing loss and Ménière`s Disease. ^[33] It is noteworthy that, the same study found no association between *IL-1 β* (-511 C/T) gene polymorphism and sudden sensorial hearing loss.

References

1. Araújo LF, Coelho CG, Mendonça ET, Vaz AVM, Siqueira-Batista R, Cotta RMM. Evidências da contribuição dos programas de assistência ao idoso na promoção do envelhecimento saudável no Brasil. *Rev. Panam. Salud Publica* 2011;30:80-86.
2. Veras R. A novidade da agenda social contemporânea: a inclusão do cidadão de mais idade. *A terceira idade* 2003;14:6-9
3. Camarano AA, Beltrão KI, Pascom ARP, Medeiros M, Goldani AM. Como vive o idoso Brasileiro? In: Camarano AA, editor. 1st edn. *Muito além dos 60: os novos idosos brasileiros* Rio de Janeiro: IPEA.1991.p.19-71.
4. Lima MG, Barros MBA, César CLG, Goldbaum, M, Carandina L, Ciconelli RM. Impact of chronic disease on quality of life among the elderly in the state of São Paulo, Brazil: a population-based study. *Pan am j public health* 2009;25:314-321.
5. Roth TN, Hanebuth D, Probst R. Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. *Eur Arch Otorhinolaringol* 2011; 268:1101-1107.
6. Paiva KM, César CG, Alves MCGP, Barros MBA, Carandina L, Goldbaum, C. Aging and self-reported hearing loss: a populational based study. *Cad. Saúde Pública* 2011; 27:1292-1300.
7. Arakawa AM, Sitta EI, Caldana ML, Sales-Peres SHC. Literature review on epidemiological studies conducted in audiology in Brazil. *Rev. Cefac* 2011;13:152-158.
8. Agrawal Y, Platz EA, Niparko JK. Risks Factors for hearing loss in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2002. *Otol. Neurotol* 2009;30:139-145.
9. Bilton TL, Ramos LR, Ebel S, Teixeira LS, Tega LP. Prevalência da deficiência auditiva em uma população idosa. *Mundo da Saúde* 1995;21:218-25.
10. Keithley EM, Wang X, Barkdull GC. Tumor necrosis factor alpha can induce recruitment of inflammatory cells to the cochlea. *Otol. Neurotol* 2008;29:854–859.
11. 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;4:139–147.
12. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011;117:3720-3732.
13. Hwang J, Chen J, Yang S, Wang M, Chan Y. Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-1B genes in the cochlea and inferior colliculus in salicylate-induced tinnitus. *Journal of neuroinflammation* 2011;8:30.
14. Santilla S, Savianainen K, Hurme M. Presence of *IL-1Ra* allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced *IL-1 β* production *in-vitro*. *Scand. J. Immunol* 1998;47:195-8.

15. 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;102:379-383.
16. Mahé Y; Oppenheim JJ. Interleukin 1. In: Roitt IM, Delves PJ, editors. *Encyclopedia of immunology*. 1st edn. London: academic press.1992.p.897-901.
17. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq I polymorphism in the human interleukin – 1B gene correlate with IL 1B secretion in vitro. *Eur J Clin Invest*1992;22: 396-402.
18. Yoshida T, Sugiura M, Naganawa S, Teranishi M, Nakata S, Nakashima T. Three-dimensional fluid-attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging findings and prognosis in sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 2008;118:1433-7.
19. Raosoft Sample Size Calculator [internet]. [cited 2012 feb 15] Available from <http://www.raosoft.com/samplesize.html>.
20. Spirduso, WW. *Dimensões Físicas do envelhecimento*. 2nd edn. Barueri: Manole; 2005.p.75-80.
21. Comitê Nacional de Ruído e Conservação Auditiva. *Recomendações para a avaliação dos prejuízos ocasionados pela Perda Auditiva Induzida pelo Ruído*, Carta aos editores, *Acta AWHO* 1996;16:45.
22. Amorim RB, Lopes AC, Santos KTP, Melo ADP, Lauris JRP. Alterações Auditivas da Exposição Ocupacional em Músicos . *Arq. Int. Otorrinolaringol* 2008;12:377-383.
23. Davis H, Silverman SR. *Hearing and deafness*. 3rd edn. New York: Holt, Rinehart and Winston; 1970.p. 130-145.
24. Orlerup 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;39:225-235.
25. Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise –Induced damaged cochlea. *Journal of neuroscience research* 2006;83:575-583.
26. Hirose K, Discolo CM, Keasler JR, Ransohoff R. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J. Comp. Neurol* 2005;489:180-194.
27. Chua K, Lau T, Tee Y, Tan S, Lian L. Genetic polymorphisms of the interleukin – 1 beta (IL-1B) – 511 and + 3954 Single nucleotide Polymorphisms (SNPs) in malaysian Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients. *Journal of Health Sciences* 2009;55:657-662.
28. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1b gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet* 2006;15:519-529.

29. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TWF, *et al.* Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1B gene with secretion of interleukin-1B protein. *Arthritis reum* 2004;50:1976-1983.
30. Samuel EA, Burrows A, Kerscher E. Cytokine regulation of mucin in a human middle ear epithelial model. *Cytokine* 2009;41:38-43.
31. Zhang R, Sun L, Hayashi Y, Liu X, Koyama S, Wu Z, *et al.* Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin -1 beta. *Neurobiol Dis* 2010;38:68-77.
32. Côrrea Filho HR, Costa LC, Hoene EL, Pérez MAG, Nascimento LCR, Moura EC. Perda auditiva induzida por ruído e hipertensão em condutores de ônibus. *Rev Saúde Pública* 2002;36:693-701.
33. Furuta T, Teranishi M, Uchida Y, Nishio N, Kato K, Otake H, *et al.* Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden sensorineural hearing loss and Ménière`s disease. *International journal of immunogenetics* 2011;38:249-254.

Table 1. General characteristics and allele/genotypes frequencies among Brazilian elderly (n=363)

| Characteristics | n | % |
|---|----------|----------|
| <i>Gender</i> | | |
| Male | 125 | 34.4 |
| Female | 238 | 65.6 |
| <i>Ethnicity</i> | | |
| White | 219 | 60.3 |
| No-White | 144 | 39.7 |
| <i>Groups</i> | | |
| Healthy control | 71 | 19.5 |
| Hearing Loss with history of occupational noise-exposure | 99 | 27.3 |
| Hearing Loss without history of occupational noise-exposure | 193 | 53.2 |
| <i>Genotypes</i> | | |
| CC (wild-type homozygotes) | 182 | 50.1 |
| TT (mutant homozygotes) | 62 | 17.1 |
| CT (heterozygotes) | 119 | 32.8 |
| <i>Grouped genotypes</i> | | |
| T- (CC) | 182 | 50.1 |
| T+ (TT + CT) | 181 | 49.9 |
| <i>Alleles</i> | | |
| C Allele | 483 | 66.5 |
| T Allele | 243 | 33.5 |

Table 2. Association between the *IL-1B* + 3954 (rs1143634) genotypes frequencies and hearing loss related of history of occupational noise exposure (n=363)

| | Groups | | |
|--------------------------------------|------------------------|---|----------------------|
| | Healthy control | Hearing Loss related of history of occupational noise exposure | |
| | | N (%) | Yes N (%) |
| <i>Genotypes^a</i> | | | |
| CC | 33 (18.1) | 53 (29.1) | 96 (52.7) |
| TT | 12 (19.4) | 15 (24.2) | 35 (56.5) |
| CT | 26 (21.8) | 31 (26.1) | 62 (52.1) |
| <i>Grouped genotypes^b</i> | | | |
| T- | 33 (18.1) | 53 (29.1) | 96 (52.7) |
| T+ | 38 (21.0) | 46 (25.4) | 97 (53.6) |

^a $\chi^2 = 1.176$; p = 0.374

^b $\chi^2 = 0.849$; p = 0.379

CONCLUSÃO GERAL

Não foi verificada associação entre o polimorfismo no gene da *IL-1β*+3954 e a perda auditiva associado ao histórico de exposição ocupacional ao ruído. Deve-se pesquisar as interações entre a ação desta interleucina com outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, assim como analisar outras regiões polimórficas neste gene como também, em outros genes que codificam outras interleucinas.

REFERÊNCIAS

1. Araújo, L. F; Coelho, C. G; Mendonça, E. T; Vaz, A. V. M; Siqueira-Batista, R; Cotta, R. M. M. Evidências da contribuição dos programas de assistência ao idoso na promoção do envelhecimento saudável no Brasil. *Rev. Panam. Salud Publica* 2011;30(1):80-86
2. Veras, R. A novidade da agenda social contemporânea: a inclusão do cidadão de mais idade. *A terceira idade*. 2003;14(28):6-9
3. Sousa, V. C; Saldanha, A. A; Araújo, L. F. Viver com Aids na Terceira idade. Em: Congresso virtual HIV/AIDS. 2006. Disponível em: http://aidscongress.net/modules/webc_aidscongress/comunicacionhtml.aspx?mid=3&commid=324. Acessado em 30/10/2011
4. Lima, M. G; Barros, M. B. A; César, C. L. G; Goldbaum, M; Carandina, L. Ciconelli, R. M. Impact of chronic disease on quality of life among the elderly in the state of São Paulo, Brazil: a population-based study. *Pan am j public health*. 2009. 25(4): 314-321
5. Roth, T. N; Hanebuth, D; Probst, R. Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. 2011. 268:51101-1107
6. Paiva, K. M; César, C. G; Alves, M. C. G. P; Barros, M. B. A; Carandina, L; Goldbaum, C. Aging and self-reported hearing loss: a populational based study. *Cad. Saúde Pública*. 2011. 27(7):1292-1300
7. Arakawa, A. M; Sitta, E. I; Caldana, M. L; Sales-Peres, S. H. C. Literature review on epidemiological studies conducted in audiology in Brazil. *Rev. Cefac*. 2011. 13 (1):152-158
8. Agrawal, Y; Platz, E. A; Niparko, J. K. Risks Factors for hearing loss in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2002. *Otol. Neurotol*. 2009. 30: 139-145
9. Keithley, E.M; Wang, X; Barkdull, G.C; Tumor necrosis factor alpha can induce recruitment of inflammatory cells to the cochlea. *Otol. Neurotol*.2008. 29: 854–859.
10. Smith, A. J. P; Humphries, S. E. Cytokine and Cytokine gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine & growth factors review*. 2009. 20: 43-59
11. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011.117(14):3720-3732
12. Roit, I. M. *Essential immunology*, 8th edition . Blackwell Scientific Publications. 1994. London: 3-39
13. Dinarello, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB, J*. 1994. 8: 1314-1325
14. Mahé, Y; Oppenheim, J. J. Interleukin 1. In *Encyclopedia of immunology* (Roitt, I. M; Delves, P. J) vol. 2. 1992. 897-901
15. Chua,K; Lau, T; Tee, Y; Tan, S; Lian, L; Genetic polymorphisms of the interleukin – 1 beta (IL-1B) – 511 and + 3954 Single nucleotide Polymorphisms (SNPs) in malaysian

- Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients. 2009. *Journal of Health Sciences*. 55: 657-662
16. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pr&tema=resultuniverso_censo2010 acessado em outubro de 2011.
 17. ASHA. (2011). (American Speech-Language-Hearing Association): www.asha.org. acessado em 30/10/2011
 18. Jerger, S; Jeger, J. Alterações auditivas:um manual para avaliação clínica.São Paulo: Atheneu. 1998.
 19. Nudelmann, A.A; Costa, E. A; Seligman, J; Ibañez, R. N. Perda auditiva induzida pelo ruído. Porto Alegre: Bagagem. 1997
 20. Lin, F. R; Metter, E. J; O'Brien, R. J; Resnick, S. M; Zonderman, A; Ferruci, L. Hearing Loss and incident dementia. *Arch Neurol*. 2011. In Press
 21. Hickson, L; Wood, J; Chaparro, A; Lacherez, P; Marszaleck, R. Hearing impairment affects older people's ability to drive in the presence of distracters. *J Am Geriatr Soc*. 2010. 58:1097-1103
 22. Viljanen, A; Kaprio, J; Pykko, I; Sorri, M; Koskenvuo, M; Rantanen, T. Hearing acuity as predictor of walking difficulties in older woman. *J Am Geriatr Soc*. 2009. 57 (12): 2282-2286
 23. Tun, P. A; McCoy, S; Wyngfield, A. Aging, hearing acuity, and attentional costs of effortful listening. *Psychol Aging*. 2009. 24 (3): 761-766
 24. Dalton, D. S; Cruickshanks, K. J. Klein, B. E; Klein, R; Wiley, T.I; Nondahl, D.M; The impact of hearing loss on quality of life in older adults. *Gerontologist*. 2003. 43 (5): 661-668
 25. Zhan, W; Cruickshanks, K.J; Klein, B. E; Klein, R; Huang, G. H; Pankow, J.S. Generation differences in the prevalence of hearing impairment in older adults. *Am J Epidemiol*. 2010. 171: 260-266
 26. Uchino, B.N. Social support and health. A review of physiological process potentially underlying links to diseases outcomes. *J Behav Med*. 2006. 29 (4): 377-384
 27. Guerra, M. R; Lourenço, P. M. C; Bustamante-Teixeira, M. T; Alves, M. J. M; Prevalência da perda auditiva induzida por ruído em empresa de metalurgia. *Rev Saúde Pública*. 2005. 39 (2): 238-244
 28. Huyghe, J. R., Van Laer, L., Hendrickx, J.-J., Fransen, E., Demeester, K., Topsakal, V., Kunst, S., Manninen, M., Jensen, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Baur, M., and 19 others Genome-wide SNP-based linkage scan identifies a locus on 8q24 for an age-related hearing impairment trait. *Am. J. Hum. Genet*. 2008. 83: 401-407
 29. Van Laer, L., Van Eyken, E., Fransen, E., Huyghe, J. R., Topsakal, V., Hendrickx, J.-J., Hannula, S., Maki-Torkko, E., Jensen, M., Demeester, K., Baur, M., Bonaconsa, A., and 23

others The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCEP2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum. Molec. Genet.* 2008. 17: 159-169.

30. Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003. 4:339–352.

31. Juhn, S.K., Rybak, L.P. Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol.* 1981. 91, 529–534.

32. Hirose, K., Discolo, C.M., Keasler, J.R., Ransohoff, R. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J. Comp. Neurol.* 2005. 489, 180–194.

33. Ma, C., Billings, P., Harris, J.P., Keithley, E.M. Characterization of an experimentally induced inner ear immune response. *Laryngoscope* . 2000. 110, 451–456.

34. Satoh, H., Firestein, G.S., Billings, P.B., Harris, J.P., Keithley, E.M. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope.* 2002. 112, 1627–1634.

35. 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, 529–532.

36. Okano, T., Nakagawa, T., Kita, T., Kada, S., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ito, J. Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *J. Neurosci. Res.* 2008. 86, 1758–1767.

37. Tan, B.T., Lee, M.M., Ruan, R. Bonemarrow-derived cells that home to acoustic deafened cochlea preserved their hematopoietic identity. *J. Comp. Neurol.* 2008. 509, 167–179.

38. Wang, X., Truong, T., Billings, P.B., Harris, J.P., Keithley, E.M. Blockage of immune-mediated inner ear damage by etanercept. *Otol. Neurotol.* 2003. 24, 52–57.

39. So, H., Kim, H., Lee, J.H., Park, C., Kim, Y., Kim, E., Kim, J.K., Yun, K.J., Lee, K.M., Lee, H.Y., Moon, S.K., Lim, D.J., Park, R. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NFkappaB. *J. Assoc. Res.* 2007. *Otolaryngol.* 8, 338–355.

40. Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano H J, Shibata S, Yamashita D, Masuda M, Mihara M, Ohsugi Y, Ogawa K, Okano H. Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neuroscience Research* 66 (2010) 345–352.

41. Hashimoto S, Billings P, Harris JP, Firestein GS, Keithley EM. Innate immunity contributes to cochlear adaptive immune responses. *Audiol Neurootol.* 2005. 10:35–43.

42. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of agerelated hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 1996. 93:181– 187.

43. Davis, R. R., Newlander, J. K., Ling, X., Cortopassi, G. A., Krieg, E. F. & Erway, L. C. Genetic basis for susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res.* 2001. 155, 82–90.
44. Harding, G. W., Bohne, B. A. & Vos, J. D. The effect of an age-related hearing loss gene (Ahl) on noise-induced hearing loss and cochlear damage from low-frequency noise. *Hear Res.* 2005. 204, 90–100
45. Kozel, P. J., Davis, R. R., Krieg, E. F., Shull, G. E. & Erway, L. C. Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res.* 2002. 164, 231–239.
46. Rabinowitz, P.M., PierceWise, J., Sr., Hur Mobo, B., Antonucci, P. G., Powell, C. & Slade, M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear Res.* 2002. 173, 164–171.
47. Fortunato, G., Marciano, E., Zarrilli, F., Mazzaccara, C., Intriери, M., Calcagno, G., Vitale, D. F., La Manna, P., Saulino, C., Marcelli, V. & Sacchetti, L. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. *Clinical chemistry.* 2004. 50, 2012–2028.
48. Carlsson, P. I., Van Laer, L., Borg, E., Bondeson, M. L., Thys, M., Fransen, E. & Van Camp, G. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res.* 2005. 202, 87–96.
49. Konings, A., Van Laer, L., Pawelczyk, M., Carlsson, P. I., Bondeson, M. L., Rajkowska, E., Dudarewicz, A., Vandevælde, A., Fransen, E., Huyghe, J., Borg, E., Sliwinska-Kowalska, M. & Van Camp, G. Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Hum Mol Genet.* 2007. 16, 1872–1883.
50. Carlsson, P. I., Borg, E., Grip, L., Dahl, N. & Bondeson, M. L. Variability in noise susceptibility in a Swedish population: The role of 35delG mutation in the Connexin 26 (GJB2) gene. *Audiol Med.* 2004. 2, 123–130.
51. Van Eyken, E., Van Laer, L., Fransen, E., Topsakal, V., Hendrickx, J. J., Demeester, K., Van De Heyning, P., Maki-Torkko, E., Hannula, S., Sorri, M., Jensen, M., Parving, A., Bille, M., Baur, M., Pfister, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Orzan, E., Espeso, A., Stephens, D., Verbruggen, K., Huyghe, J., Dhooge, I., Huygen, P., Kremer, H., Cremers, C., Kunst, S., Manninen, M., Pyykko, I., Rajkowska, E., Pawelczyk, M., Sliwinska-Kowalska, M., Steffens, M., Wienker, T. & Van Camp, G. The contribution of GJB2 (Connexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otol Neurotol.* 2007. 28, 970–975.
52. Van Laer, L., Carlsson, P. I., Ottschytsch, N., Bondeson, M. L., Konings, A., Vandevælde, A., Dieltjens, N., Fransen, E., Snyders, D., Borg, E., Raes, A. & Van Camp, G. The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss. *Hum Mutat.* 2006. 27, 786–795.
53. Liu Y-M, Li X-D, Guo X, Liu B, Lin A-H, Ding Y-L e Rao S-Q. SOD2 V16A SNP in the mitochondrial targeting sequence is associated with noise induced hearing loss in Chinese workers. *Disease Markers.* 2010. 28: 137–147.

54. Yang M, Tan H, Yang Q et al: Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile
55. Saiko S., Yasue U., Tsutomu N., Fujiko A., Hiroshi S. The association between gene polymorphisms in uncoupling proteins and hearing impairment in Japanese elderly. *Acta Oto-Laryngologica*; 2010. 130 (4): 487-492.
56. Brant, L. J; Gordon-Salant, S; Pearson, J. D. Risk Factors related to age-associated hearing loss in the speech frequencies. *J. Am. Acad. Audiol.* 1996. 7 (3):152-160
57. Tonnet, C. A; Nobrega, O. T. Immunosenescence: the association between leukocytes, cytokines and chronic diseases. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 2008. 2: 259-273
58. Abbas, A. K; Lichtman, A. H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico.* 3e. Rio de Janeiro: Elsevier, 1994
59. Dinarello, C. A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Advances in immunology.* 1989. 44:153-205.
60. Kreutzberg, K. Peripheral but not central axotomy induces changes in janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcriptions (STAT). *European Journal of Neuroscience.* 2000. 12 (4):1165-1176
61. Vitkovic, L; Bockaert, J; Claude, J. “Inflammatory” cytokines: neuromodulators in normal brains? *Journal of neurochemistry.* 2000. 74 (2):457-471
62. Fahy, R. J; Doseff, A. I; Wewers, M. D. Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blockade by endotoxin and is independent of caspase-1. *The journal of immunology.* 1999. 163:1755-1762
63. Cooke, M. M; McCarthy, G. M; Sallis, J. D; Morgan, M.P. Phosphocitrate inhibits calcium hydroxyapatite induced mitogenesis and upregulation of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1 beta and cyclooxygenase-2 mRNA in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003. 79: 253-263
64. Wolf, J. S; Chen, Z; Dong, G; Sunwoo, J. B; Bancroft, C. C; Capo, D. E; Yeh, N. T; Mukaida, N; Van-Waes, C. IL 1-alpha promotes nuclear factor kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2001. 7: 1812-1820
65. Singer, C. F; Kronsteiner, N; Hudelist, G; Marton, E; Walter, I; Kubista, M; Czerwenka, K; Schriber, M; Seifert, M; Kubista, E. Interleukin-1 system and sex steroid receptor expression in human breast cancer: interleukin-1 alpha protein secretion is correlated with malignant phenotype. *Clin. Cancer res.* 2003. 9:4877-4883
66. Grim, C; Kantelhardt, E; Heinze, G; Poltrauter, S; Zeillinger, R; Kölbl, H; Reinthaller, A; Hefler, L. the prognostic value of four interleukin-1 gene polymorphisms in Caucasian women with breast cancer – a multicentric study. *BMC Cancer.* 2009. 9:78
67. Furuta, T; Teranishi, M; Uchida, Y; Nishio, N; Kato, K; Otake, H; Yoshida, T; Tagaya, M; Suzuki, H; Sugiura, M; Sone, M; Hiramatsu, M; Sugiura, s; Ando, F; Shimokata, H; Nakashima, T. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden

sensorineural hearing loss and Ménière`s disease. *International journal of immunogenetics*. 2011. 38 :249-254

68. 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. 4:139–147.

69. Chen, H; EWilkins, L. M; Aziz, N; Cannigs, C; Wyllie, D; Bingle, C; Rogus, J; Beck, J; Duff, G.W. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1 β gene affect transcription according to haplotype context. *Human Molecular genetics*. 2006. 15 (4): 519-529