



ARTIGO ORIGINAL

## Variants in the interleukin 8 gene and the response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis<sup>☆,☆☆</sup>



Larissa Lazzarini Furlan<sup>a</sup>, José Dirceu Ribeiro<sup>b</sup>, Carmen Sílvia Bertuzzo<sup>c</sup>, João Batista Salomão Junior<sup>d,e</sup>, Dorotéia Rossi Silva Souza<sup>f</sup> e Fernando Augusto Lima Marson<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Pediatria, Campinas, SP, Brasil

<sup>c</sup> Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Genética Médica, Campinas, SP, Brasil

<sup>d</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Hospital Universitário, Departamento de Pediatria, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>e</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Hospital Universitário, Departamento de Pneumologia Pediátrica, São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>f</sup> Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Centro de Pesquisa de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Molecular, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido em 2 de agosto de 2016; aceito em 9 de janeiro de 2017

### KEYWORDS

CFTR;  
Disease severity;  
Interleukin 8;  
Lung function

### Abstract

**Objective:** Interleukin 8 protein promotes inflammatory responses, even in airways. The presence of interleukin 8 gene variants causes altered inflammatory responses and possibly varied responses to inhaled bronchodilators. Thus, this study analyzed the interleukin 8 variants (rs4073, rs2227306, and rs2227307) and their association with the response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis patients.

**Methods:** Analysis of interleukin 8 gene variants was performed by restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction. The association between spirometry markers and the response to inhaled bronchodilators was evaluated by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The analysis included all cystic fibrosis patients, and subsequently patients with two mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene belonging to classes I to III.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.03.005>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Furlan LL, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Salomão Junior JB, Souza DR, Marson FA. Variants in the interleukin 8 gene and the response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis. J Pediatr (Rio J). 2017;93:639–48.

<sup>☆☆</sup> Estudo feito na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [fernandolimamarson@hotmail.com](mailto:fernandolimamarson@hotmail.com) (F.A. Marson).

## PALAVRAS-CHAVE

CFTR;

Gravidade da doença;

Interleucina 8;

Função pulmonar

**Results:** This study included 186 cystic fibrosis patients. There was no association of the rs2227307 variant with the response to inhaled bronchodilators. The rs2227306 variant was associated with FEF<sub>50%</sub> in the dominant group and in the group with two identified mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. The rs4073 variant was associated with spirometry markers in four genetic models: co-dominant (FEF<sub>25-75%</sub> and FEF<sub>75%</sub>), dominant (FEV<sub>1</sub>, FEF<sub>50%</sub>, FEF<sub>75%</sub>, and FEF<sub>25-75%</sub>), recessive (FEF<sub>75%</sub> and FEF<sub>25-75%</sub>), and over-dominant (FEV<sub>1</sub>/FVC).

**Conclusions:** This study highlighted the importance of the rs4073 variant of the interleukin 8 gene, regarding response to inhaled bronchodilators, and of the assessment of mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Variantes no gene da interleucina 8 e a resposta a broncodilatadores inalatórios na fibrose cística

### Resumo

**Objetivo:** A proteína interleucina 8 promove respostas inflamatórias, o que inclui sua atuação nas vias aéreas. A presença de variantes no gene da interleucina 8 causa respostas inflamatórias alteradas e possivelmente respostas variadas ao uso de broncodilatadores inalatórios. Assim, este estudo analisou as variantes da interleucina 8 (rs4073, rs2227306, rs2227307) e sua associação à resposta a broncodilatadores inalatórios em pacientes com fibrose cística.

**Métodos:** Foi feita análise das variantes genéticas da interleucina 8 por *restriction fragment length polymorphism* da reação em cadeia da polimerase. A associação entre os marcadores da espirometria e a resposta a broncodilatadores inalatórios foi feita pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A análise incluiu todos os pacientes com fibrose cística e posteriormente pacientes com duas mutações no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* pertencentes às Classes I a II.

**Resultados:** Este estudo incluiu 186 pacientes com fibrose cística. Não houve associação da variante rs2227307 à resposta a broncodilatadores inalatórios. A variante rs2227306 foi associada a FEF<sub>50%</sub> no grupo dominante e no grupo com duas mutações identificadas no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. A variante rs4073 foi associada a marcadores da espirometria em quatro modelos genéticos: codominante (FEF<sub>25-75%</sub> e FEF<sub>75%</sub>), dominante (VEF<sub>1</sub>, FEF<sub>50%</sub>, FEF<sub>75%</sub> e FEF<sub>25-75%</sub>), recessivo (FEF<sub>75%</sub> e FEF<sub>25-75%</sub>) e overdominante (VEF<sub>1</sub>/CVF).

**Conclusões:** Este estudo destaca, principalmente, a importância da variante rs4073 do gene da interleucina 8, na resposta a broncodilatadores inalatórios, concomitantemente ao genótipo das mutações no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

A resposta a broncodilatadores inalatórios (BD) na fibrose cística (FC) (OMIM: n° 219700) é muito variável e depende do genótipo do *RTFC* (Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística), dos sintomas pulmonares e, principalmente, de variantes nos genes modificadores, como o Receptor Adrenérgico Beta 2 (*ADRB2*).<sup>1</sup> Até agora, apenas alguns estudos investigaram essa resposta.

As mutações no gene do *RTFC* causam FC, devido a deficiência, disfunção ou ausência da proteína do *RTFC*.<sup>2</sup> A FC é caracterizada por um ciclo contínuo de inflamação crônica das vias aéreas, que pode ser exacerbada pela interleucina 8 (*IL-8*), um importante mediador pró-inflamatório. A *IL-8* é responsável por iniciar e aumentar a resposta provocadora na presença de patógenos específicos, causa ativação

e migração de neutrófilos do sangue periférico para os tecidos.<sup>3</sup> A inflamação crônica das vias aéreas é o caminho comum final de lesão pulmonar. Ela é responsável pelo aumento na permeabilidade vascular, contribui para edema intersticial, alveolar e das vias aéreas.

O tratamento da doença pulmonar na FC inclui anti-inflamatórios, corticosteroides inalatórios, antibióticos, mucolítico, solução salina hipertônica e fisioterapia. Dentre as possíveis terapias, há pouca comprovação que corrobore um papel dos BD na FC.<sup>4,5</sup> Contudo, os BD normalmente são prescritos por um tempo maior devido a episódios de pieira e dispneia na FC.<sup>6</sup> Os BD reduzem a liberação de mediadores, responsáveis pelo recrutamento e pela ativação de células inflamatórias, ativam a neurotransmissão colinérgica, e por melhorar a permeabilidade vascular. Eles também aumentam o transporte mucociliar, levam à redução da inflamação

pulmonar.<sup>7</sup> A resposta a BD depende, em parte, da proteína do *RTFC*, que interage com a proteína do ADRB2 para promover broncodilatação.<sup>8</sup> A espirometria é o principal método de avaliar a função pulmonar, a gravidade e a progressão da doença, bem como a resposta a BD.

Inflamação neutrofílica intensa e baixa hiperreatividade brônquica são características comumente observadas na FC.<sup>9</sup> Ademais, a resposta das variantes genéticas aos BD é pouco conhecida.<sup>1</sup> Pode-se destacar o papel da *IL-8* no componente neutrofílico da doença pulmonar na FC. Os genes que podem estar associados à gravidade da FC e possivelmente à resposta a BD foram relacionados aqui e na literatura científica de todo o mundo.<sup>1,10-12</sup> O gene da *IL-8* deve ser destacado, pois ele tem influência direta sobre a inflamação pulmonar e pode ser eficaz na resposta a BD. Portanto, este estudo comparou as variantes genéticas da *IL-8* rs4073, rs2227306 e rs2227307 com a resposta a BD em pacientes com FC, com o uso da espirometria.

## Material e métodos

### Pacientes

Foi conduzido um estudo transversal com 186 pacientes com FC, selecionados em dois centros universitários de referência (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e Universidade de Campinas) para tratamento de FC, de 2013 a 2015. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil (n° 528/2008). Todos os participantes foram informados sobre o estudo e assinaram o Documento de Consentimento Informado. Para os pacientes com menos de 18 anos, o Consentimento Informado foi assinado pelo pai/mãe ou guardião. O estudo seguiu as recomendações da Declaração de Helsinque.

O diagnóstico de FC foi confirmado pela presença de duas concentrações alteradas de sódio e cloreto no suor (nível de cloreto acima de 60 mEq/L). Além disso, nenhum paciente foi submetido a teste inicial de tripsinogênio imunorreativo (IRT). Em um grupo de 91 pacientes, houve duas mutações no gene do *RTFC* pertencentes às classes I, II e/ou III (associadas à maior gravidade da doença, devido à ausência ou não funcionalidade da proteína do *RTFC*);<sup>13</sup> 60 pacientes não apresentaram mutação identificada do gene do *RTFC* ou apresentaram duas mutações que pertencem às classes IV, V ou VI; e 35 pacientes apresentaram uma mutação no gene do *RTFC* que pertence às classes I, II ou III e uma mutação não identificada ou pertencente às classes IV, V ou VI (tabela 1).

### Variáveis clínicas

As seguintes variáveis foram analisadas: escores clínicos (Shwachman-Kulczycki, Kanga e Bhalla); índice de massa corporal (IMC) de pacientes com mais de 18 anos, com a fórmula  $IMC = \text{peso}/\text{altura}$ ;<sup>2</sup> a versão 3.0.1 do programa Anthro (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2006) foi usada para crianças com menos de cinco anos e a versão 1.0.2 do programa Anthro Plus (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2007) foi usada para crianças de cinco anos a adolescentes de 18 anos; idade do paciente e idade na época do diagnóstico; primeiro sintoma clínico (um sintoma geral, sintomas

pulmonares e digestivos); período até a primeira colonização por *Pseudomonas aeruginosa* mucoide (PAM); microrganismos identificados na cultura de escarro de rotina (*P. aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* e *Staphylococcus aureus* mucoide e não mucoide); saturação de oxigênio no sangue arterial transcutânea (SaO<sub>2</sub>); espirometria e comorbidades (pólipos nasais, osteoporose, íleo meconial, *diabetes mellitus* e insuficiência pancreática).

A espirometria foi feita em pacientes com mais de sete anos, com o espirômetro CPFS/D (MedGraphics, Saint Paul, Minnesota, EUA). Os dados foram registrados pela versão 3.8B do software PF BREEZE para Windows 95/98/NT (American Thoracic Society) e avaliados em percentagem de valores preditivos para: capacidade vital forçada (% de CVF), volume expiratório forçado no 1° segundo da CVF (VEF<sub>1</sub>), proporção VEF<sub>1</sub>/CVF, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF (FEF<sub>25%</sub>), fluxo expiratório forçado a 50% da CVF (FEF<sub>50%</sub>), fluxo expiratório forçado a 75% da CVF (FEF<sub>75%</sub>), fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CVF (FEF<sub>25-75%</sub>), fluxo expiratório forçado máximo (FEF<sub>max</sub>) e volume de reserva expiratória (VRE). Os dados da espirometria são mostrados em percentual do valor preditivo de acordo com as equações de Polgar e Promadhat (1971); Pereira et al. (2007) e Duarte et al. (2007).<sup>14-16</sup>

Todos os pacientes submetidos a espirometria fizeram o teste antes e 15 minutos após administração dos BD [albutrol-C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (400 mg)]. Os pacientes em terapia com BD foram orientados a interromper a medicação oito horas antes da espirometria, caso estivessem em tratamento com BD de curta ação, e 48 horas antes, caso estivessem em tratamento com BD de ação prolongada. A mudança no percentual pós-BD foi usada na análise estatística. Os critérios de resposta a BD, definidos como aumento de > 12% e 200 mL de VEF1 inicial, foram usados como o segundo modelo para avaliar a associação entre as variantes do gene da *IL-8* e a resposta a BD.

### Extração do DNA e genotipagem

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico com o método padrão fenol-clorofórmio e quantificado por espectrofotômetro GE NanoVue™ (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, EUA). Neste estudo, a concentração final da amostra foi estabelecida em 50 ng/μL.

As mutações do *RTFC* foram analisadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) (F508del) após digestão enzimática (G542X, R1162X, R553X, G551D e N1303 K). Outras mutações no gene do *RTFC* podem ser identificadas por sequenciamento ou com o uso do método SALSA MPLA (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação) Kit P091-C1 CFTR-MRC-Holland S4X, 2183A > G, 1717-G > A, I618 T com MegaBace1000® (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, EUA) e ABI3500 (Biosistemas Aplicados – Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil).<sup>17</sup>

As variantes do gene da *IL-8* foram analisadas por PCR após digestão com enzimas de restrição. Para a variante rs4073, foram usados os iniciadores 5'-CCA TCA TGA TAG CAT CTG TA-3' e 5'-CCA CAA TTT GGT GAA TTA TTA A-3' e a enzima de restrição *AseI*; para a variante rs2227306, foram usados os iniciadores 5'-CTC TAA CTC TTT ATA TAG GAA TT-3' e 5'-GAT TGA TTT TAT CAA CAG GCA-3', bem como a enzima

**Tabela 1** Distribuição dos pacientes com fibrose cística para genótipo do *RTFC* e classes de mutações identificadas.<sup>a</sup>

Genótipo	N	%	Grupo de pacientes	
- /-	55	29,6	Pacientes sem mutação no gene do <i>RTFC</i> ou com uma ou duas mutações pertencentes às classes IV, V ou VI	
V562I/-	1	0,5		
I507V/-	1	0,5		
D110H/V232H	1	0,5		
G576A/R668 C	1	0,5		
p.Glu528G > A/TG11-5 T	1	0,5		
F508del/-	23	12,4	Pacientes com uma mutação do <i>RTFC</i> pertencentes às classes I, II ou III e uma mutação não identificada ou pertencentes às classes IV, V ou VI	
G542X/-	4	2,2		
F508del/3272-26A > G	1	0,5		
F508del/P205S	1	0,5		
G542X/P205S	1	0,5		
G542X/R334 W	1	0,5		
3120 + 1G > A/L206 W	1	0,5		
622-2A > G/711 + 1G > T	1	0,5		
R1162X/-	1	0,5		
G542X/I618 T	1	0,5		
F508del/F508del	49	26,3		Pacientes com duas mutações do <i>RTFC</i> pertencentes às classes I, II e/ou III – Mutações G2 (grupo <i>CFTR-B</i> )
F508del/G542X	12	6,5		
F508del/N1303 K	5	2,7		
F508del/R1162X	3	1,6		
F508del/R553X	3	1,6		
F508del/1584-18672pbA > G	1	0,5		
F508del/c.1717-1G > A	2	1		
3120 + 1G > A/R1066 C	1	0,5		
F508del/2183AA > G	1	0,5		
F508del/2184insA	1	0,5		
Duplicação do éxon F508del/6B a 16	1	0,5		
F508del/G85E	1	0,5		
F508del/S549R (T > G)	1	0,5		
F508del/S4X	1	0,5		
G542X/2183AA > G	1	0,5		
G542X/R1162X	1	0,5		
A561E/A561E	1	0,5		
F508del/R1066 C	1	0,5		
R1070Q; S466X/G542X	1	0,5		
F508del/1812-1G > A	2	1		
2183AA > G/2183AA > G	1	0,5		
3120 + 1G > A/3120 + 1G > A	1	0,5		

N, tamanho da amostra; *RTFC*, regulador da condutância transmembrana da fibrose cística.

<sup>a</sup> Todos os pacientes avaliados neste estudo foram incluídos (grupo *RTFC-A*).

de restrição *EcoRI*; e para a variante rs2227307, foram usados os iniciadores 5'-TAA AGG TTT GAT CAA TAT AGA-3' e 5'-CTT CCT TCT AAT TCCA ATA TG-3', bem como a enzima de restrição *ScrFI*.<sup>18,19</sup> Os produtos da restrição enzimática foram submetidos a eletroforese em gel de poli-acrilamida a 12%, ou gel de agarose a 4%,<sup>18,19</sup> e corados com gel Red<sup>®</sup>.

### Análise estatística

Foi feita com a versão 22.0 do SPSS (SPSS Inc., Chicago, EUA). Foi usada a versão 3.1.9.2<sup>20</sup> do *software* GPower para calcular o poder da amostra, considerou-se o genótipo das variantes analisadas e adotou-se o poder para

valor acima de 80%. As condições a seguir foram aplicadas para calcular o poder da amostra: (teste de análise da variância no lugar do teste de Kruskal-Wallis, considerou-se que a análise de variância é um teste mais forte) tamanho do efeito=0,25,  $\alpha=0,05$ , poder=0,80, grau de liberdade do numerador=2, número de grupos=3, n° ideal=158; (teste de Mann-Whitney-bicaudal) tamanho do efeito=0,5,  $\alpha=0,05$ , poder=0,80, proporção de atribuição N2/N1=1, n° ideal=134; (teste  $\chi^2$ ) tamanho do efeito=0,3,  $\alpha=0,05$ , poder=0,80, grau de liberdade=2, n° ideal=108.

Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram usados para comparação entre diferentes genótipos e os grupos de variantes do gene da *IL-8* e a resposta a BD. Em caso de diferenças significativas entre os grupos do teste

de Kruskal-Wallis, foram feitas identificação e avaliação adicionais das diferenças entre os genótipos com o *software* para Windows MedCalc®, versão 16.1 (MedCalc® Software, Ostend, Bélgica).

O teste  $\chi^2$  e o teste exato de Fisher foram usados para comparação entre os diferentes genótipos e grupos de variantes do gene da IL-8 e a resposta a BD definidos como um aumento de > 12% e 200 mL de VEF1 inicial.

**Tabela 2** Análise descritiva dos marcadores clínicos e laboratoriais de pacientes com fibrose cística

Variáveis	Distribuição <sup>a</sup>
Sexo (masculino)	92/186 (49,5%)
Etnia (branca)	169/180 (93,9%)
Idade (meses)	169; 201,41 ± 171,98; 143 (7 a 932)
Início dos sintomas (meses)	159; 38,23 ± 114,03; 3 (0 a 720)
Diagnóstico (meses)	171; 87,90 ± 158,39; 20 (0 a 833)
Início dos sintomas digestivos (meses)	140; 41,2 ± 112,61; 3 (0 a 720)
Início dos sintomas pulmonares (meses)	156; 46,33 ± 123,64; 6 (0 a 720)
Índice de massa corporal	178; 17,28 ± 4,08; 16,28 (6,5 a 35,67)
Polipose nasal (presença)	28/162 (17,3%)
Diabetes mellitus (presença)	32/164 (19,5%)
Osteoporose (presença)	25/162 (15,4%)
Insuficiência pancreática (presença)	130/162 (80,2%)
Íleo meconial (presença)	23/162 (14,2%)
1 <sup>a</sup> Pseudomonas aeruginosa	121; 103,03 ± 171,74; 31 (0 a 872) <sup>b</sup>
P. aeruginosa mucoide (presença)	74/173 (42,8%) <sup>c</sup>
P. aeruginosa não mucoide (presença)	99/173 (57,2%) <sup>c</sup>
Achromobacter xylosoxidans (presença)	17/174 (9,8%)
Burkholderia cepacia (presença)	25/174 (14,4%)
Staphylococcus aureus (presença)	131/174 (75,3%)
SaO <sub>2</sub>	159; 94,87 ± 4,28; 96 (66 a 99)
Escore de Bhalla	113; 8,9 ± 5,77; 8 (0 a 25)
Escore de Kanga	118; 18,78 ± 5,82; 17,5 (10 a 40)
Escore de Shwachman-Kulczycki	143; 65,97 ± 16,78; 65 (20 a 95)
CVF	142; 72,13 ± 23,86; 77 (19 a 126)
FEV <sub>1</sub>	141; 60,99 ± 25,75; 63 (17 a 116)
VEF <sub>1</sub> /CVF	144; 79,08 ± 14,99; 81 (39 a 113)
FEF <sub>25%</sub>	119; 61,28 ± 31,71; 60 (7 a 138)
FEF <sub>50%</sub>	119; 46,2 ± 31,25; 40 (3 a 126)
FEF <sub>75%</sub>	116; 36,32 ± 28,77; 27,5 (4 a 142)
FEF <sub>25-75%</sub>	140; 47,16 ± 32,51; 39 (5 a 150)
FEF <sub>Max</sub>	114; 75,54 ± 25,59; 73,5 (25 a 137)
VRE	112; 80,96 ± 52,39; 69 (3 a 248)
<b>Resposta a broncodilatador inalatório</b>	
CVF	117; 1,74 ± 8,19; 1 (-17 a 32)
FEV <sub>1</sub>	117; 3,51 ± 8,0; 3 (-12 a 48)
VEF <sub>1</sub> /CVF	111; 2,14 ± 7,43; 2 (-19 a 32)
FEF <sub>25%</sub>	99; 9,99 ± 24,41; 5 (-45 a 110)
FEF <sub>50%</sub>	99; 13,08 ± 26,06; 9 (-41 a 114)
FEF <sub>75%</sub>	99; 20,93 ± 46,47; 16 (-64 a 235)
FEF <sub>25-75%</sub>	99; 12,28 ± 27,77; 9,5 (-51 a 117)
FEF <sub>Max</sub>	116; 2,63 ± 14,48; 3 (-42 a 69)
VRE	100; 23,04 ± 101,08; 0 (-90 a 670)

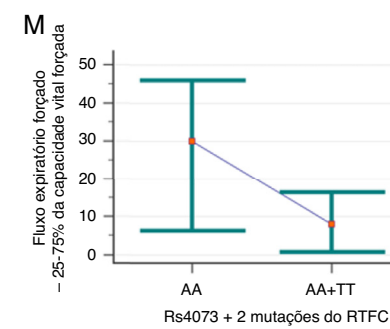
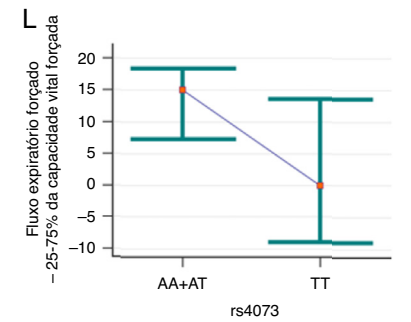
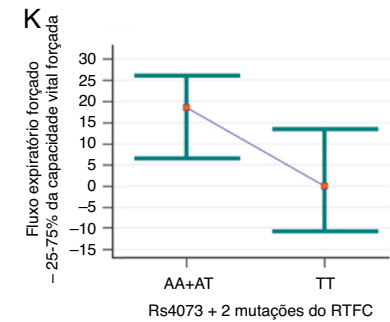
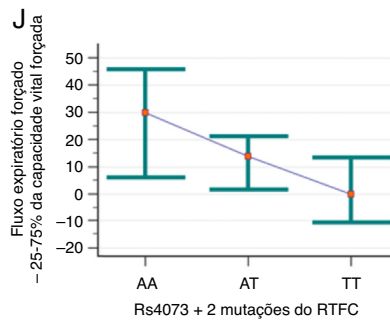
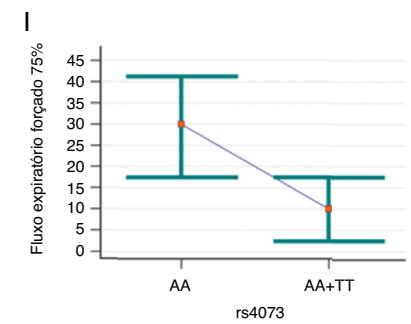
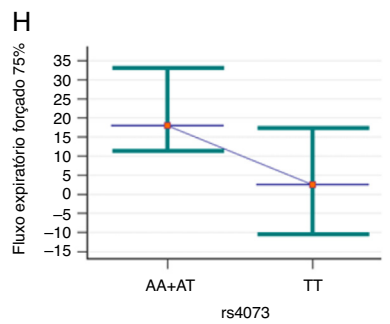
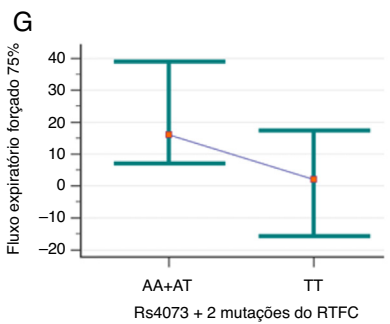
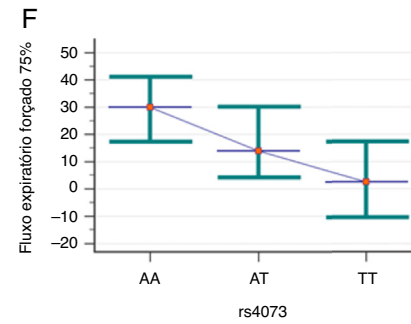
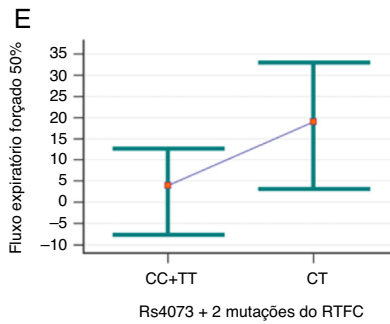
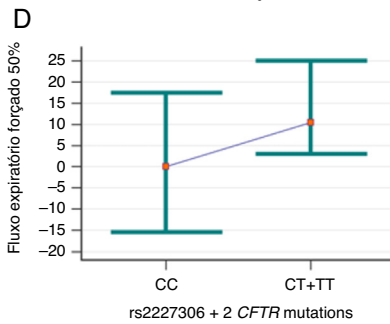
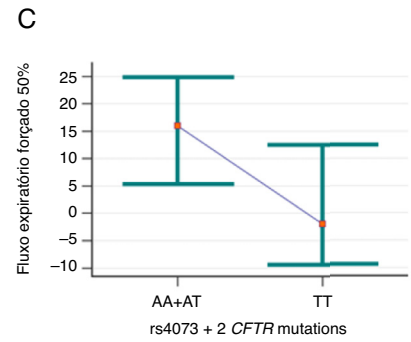
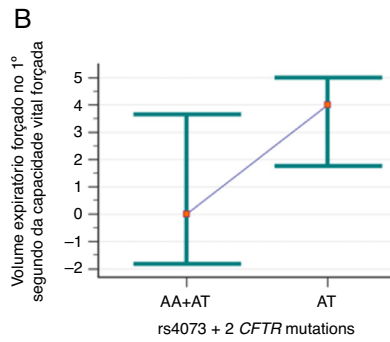
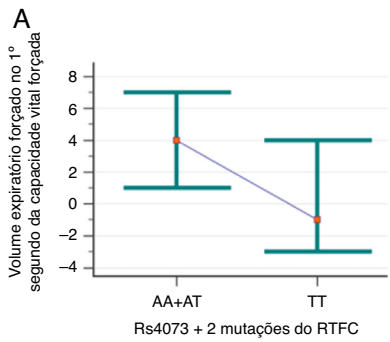
CVF, capacidade vital forçada; FEF<sub>25%</sub>, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF<sub>25-75%</sub>, médio do fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CVF; FEF<sub>50%</sub>, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF<sub>75%</sub>, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF<sub>max</sub>, fluxo expiratório forçado máximo; SaO<sub>2</sub>, saturação de oxigênio no sangue arterial; VEF<sub>1</sub>, volume expiratório forçado no 1º segundo da CVF; VRE, volume de reserva expiratória.

Os dados da espirometria são mostrados em percentual de valor preditivo. Todos os pacientes avaliados são descritos.

<sup>a</sup> Os dados com distribuição categórica são apresentados da seguinte forma: n° de variáveis/n° total (percentual); os dados com distribuição numérica são apresentados da seguinte forma: tamanho da amostra; média ± desvio padrão; mediana (mínimo a máximo).

<sup>b</sup> Os valores ausentes para primeira *P. aeruginosa* correspondem a pacientes com fibrose cística que nunca apresentaram cultura positiva para *P. aeruginosa*.

<sup>c</sup> Um paciente com fibrose cística apresentou cultura positiva para *P. aeruginosa*, com valores negativos para IgG específico do antígeno *P. aeruginosa* e o paciente foi excluído para estimativa de frequência.



Para a identificação de mutações no gene do *RTFC*, os pacientes foram analisados com base em dois contextos: (*RTFC-A*) todos os pacientes com FC, independentemente das mutações do gene ( $n=186$  pacientes); (*RTFC-B*) pacientes com duas mutações pertencentes às classes I, II e/ou III ( $n=91$  pacientes). Quanto às variantes, foram adotados quatro modelos de análise: (i) codominante (teste de Kruskal-Wallis); (ii) recessivo (teste de Mann-Whitney); (iii) dominante (teste de Mann-Whitney); (iv) superdominante (teste de Mann-Whitney), aplicados em associação às variáveis clínicas. Para todas as análises, o valor alfa foi estabelecido em 0,05.

Para análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi usado o *software* Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (OEGE).

O teste da taxa de falsa descoberta (FDR) foi aplicado para corrigir a comparação múltipla de testes. A FDR é uma abordagem ao problema de múltiplas comparações. Em vez de controlar a chance de qualquer falso, os controles da FDR controlam a proporção esperada de falsos positivos entre os resultados significativos. O limite da FDR é determinado a partir da distribuição do valor de  $p$  observado e, assim, é adaptativo ao valor de sinal nos dados.<sup>21</sup> O valor de  $p$  ( $p$ ) e o valor de  $p$  corrigido ( $p^c$ ) foram mostrados no manuscrito. A análise de desequilíbrio de ligação foi feita na versão 4.2 do *software* Haploview.

## Resultados

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com FC são descritos na [tabela 2](#). A descrição do genótipo e da frequência de alelos das variantes do gene da *IL-8* encontra-se na [tabela 3](#). A [figura 1](#) mostra os dados com valores de  $p$  e valor de  $p$  corrigido para associação das variantes do gene da *IL-8*, consideraram-se os quatro modelos de análise propostos e o genótipo do gene do *RTFC*.

A variante rs2227307 não foi associada à resposta a BD em nenhum dos modelos estudados; ao passo que a variante rs2227306 foi associada a  $FEF_{50\%}$  para pacientes com genótipo CC (modelo dominante;  $p=0,05$ ;  $p^c=0,083$ ) e genótipo CT (modelo superdominante;  $p=0,033$ ;  $p^c=0,083$ ) no grupo *RTFC-B* ([fig. 1D](#) e [E](#)).

Deve-se enfatizar de modo especial a variante rs4073, associada às variáveis de espirometria:  $FEV_1$ , proporção  $VEF_1/CVF$ ,  $FEF_{50\%}$ ,  $FEF_{75\%}$  e  $FEF_{25-75\%}$ . A menor resposta a BD foi observada para genótipo TT (modelo dominante) e pacientes do grupo *RTFC-B* a  $VEF_1$  ([fig. 1A](#)),  $FEF_{50\%}$  ([fig. 1C](#)),  $FEF_{75\%}$  ([fig. 1G](#)) e  $FEF_{25-75\%}$  ([fig. 1K](#)). O mesmo foi observado para o grupo *RTFC-A* para  $FEF_{75\%}$  ([fig. 1H](#)) e  $FEF_{25-75\%}$  ([fig. 1L](#)). Na análise codominante, o genótipo TT apresentou menor resposta a BD para  $VEF_{75\%}$  ([fig. 1F](#)) e  $FEF_{25-75\%}$  ([fig. 1J](#)), respectivamente para os grupos *RTFC-A* e *RTFC-B*. Para o indicador  $VEF_1/CVF$ , o genótipo AT nos pacientes do grupo

**Figura 1** Associação das variantes rs4073 e rs2227306 da *IL-8* (interleucina-8) à resposta a broncodilatadores inalatórios em pacientes com fibrose cística. A. Associação entre o volume expiratório forçado no 1º segundo ( $VEF_1$ ) da capacidade vital forçada (CVF) e rs4073, modelo dominante e duas mutações identificadas no gene do *RTFC* (regulador da condutância transmembrana da fibrose cística) pertencente às classes I, II e/ou III (grupo *RTFC-B*) ( $p=0,028$ ;  $p^c=0,112$ ). (AA + AT)  $n=39$ ; média de  $4,77 \pm 8,95$ ; mediana de 4 (variação de -9 a 48). (TT)  $n=21$ ; média de  $0,86 \pm 5,42$ ; mediana de -1 (variação de -6 a 15). B. Associação da proporção  $VEF_1/CVF$  à variante rs4073, modelo superdominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,029$ ;  $p^c=0,116$ ). (TT)  $n=30$ ; média de  $0,86 \pm 7,36$ ; mediana de 0 (variação de -12 a 23). (AT)  $n=29$ ; média de  $4,76 \pm 7,58$ ; mediana de 4 (variação de -9 a 32). C. Associação do fluxo expiratório forçado de 50% ( $FEF_{50\%}$ ) da CVF à variante rs4073, modelo dominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,046$ ;  $p^c=0,184$ ). (AA + AT)  $n=37$ ; média de  $17,38 \pm 24,18$ ; mediana de 16 (variação de -20 a 89). (TT)  $n=21$ ; média de  $4,95 \pm 20,80$ ; mediana de -2 (variação de -19 a 55). D. Associação do  $FEF_{50\%}$  à variante rs2227306, modelo dominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,050$ ;  $p^c=0,083$ ). (CC)  $n=15$ ; média de  $1,47 \pm 17,22$ ; mediana de 0 (variação de -20 a 29). (CT + TT)  $n=44$ ; média de  $15,84 \pm 25,04$ ; mediana de 10,50 (variação de -28 a 89). E. Associação do  $FEF_{50\%}$  à variante rs2227306, modelo superdominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,033$ ;  $p^c=0,083$ ). (CC + TT)  $n=33$ ; média de  $6,06 \pm 20,27$ ; mediana de 4 (variação de -20 a 55). (CT)  $n=23$ ; média de  $19,96 \pm 26,43$ ; mediana de 19 (variação de -28 a 89). F. Associação do fluxo expiratório forçado de 75% ( $FEF_{75\%}$ ) da CVF à variante rs4073, modelo codominante independentemente das mutações identificadas no gene do *RTFC* (grupo *RTFC-A*) ( $p=0,044$ ;  $p^c=0,058$ ). 1  $\neq$  3. (AA)  $n=28$ ; média de  $29,93 \pm 39,98$ ; mediana de 30 (variação de -47 a 142). (AT)  $n=42$ ; média de  $24,81 \pm 53,57$ ; mediana de 14 (variação de -58 a 235). (TT)  $n=28$ ; média de  $9,14 \pm 36,95$ ; mediana de 2,5 (variação de -35 a 119). G. Associação do  $FEF_{75\%}$  à variante rs4073, modelo dominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,024$ ;  $p^c=0,096$ ). (AA + AT)  $n=38$ ; média de  $33 \pm 55,23$ ; mediana de (variação de -27 a 235). (TT)  $n=21$ ; média de  $5,43 \pm 35,93$ ; mediana de 2 (variação de -35 a 119). H. Associação do  $FEF_{75\%}$  à variante rs4073, modelo dominante e grupo *RTFC-A* ( $p=0,034$ ;  $p^c=0,058$ ). (AA + AT) ( $n=70$ ; média de  $26,86 \pm 48,34$ ; mediana de 18 (variação de -58 a 235). (TT)  $n=28$ ; média de  $9,14 \pm 36,95$ ; mediana de 2,5 (variação de -35 a 119). I. Associação do  $FEF_{75\%}$  à variante rs4073, modelo recessivo e grupo *RTFC-A* ( $p=0,040$ ;  $p^c=0,058$ ). (AA)  $n=28$ ; média de  $29,93 \pm 39,98$ ; mediana de 30 (variação de -47 a 142). (AT + TT)  $n=70$ ; média de  $18,54 \pm 47,95$ ; mediana de 10 (variação de -58 a 235). J. Associação do FEF entre 25 e 75% ( $FEF_{25-75\%}$ ) da CVF à variante rs4073, modelo codominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,012$ ;  $p^c=0,024$ ). TT  $\neq$  AA e AT. (AA)  $n=9$ ; média de  $25,78 \pm 23,14$ ; mediana de 30 (variação de -21 a 57). (AT)  $n=29$ ; média de  $18,38 \pm 29,04$ ; mediana de 14 (variação de -33 a 117). (TT)  $n=21$ ; média de  $2,14 \pm 23,74$ ; mediana de 0 (variação de -51 a 65). K. Associação do  $FEF_{25-75\%}$  à variante rs4073, modelo dominante e grupo *RTFC-B* ( $p=0,007$ ;  $p^c=0,024$ ). (AA + ATT)  $n=38$ ; média de  $20,13 \pm 27,64$ ; mediana de 18,50 (variação de -33 a 117). (TT)  $n=23$ ; média de  $2,14 \pm 23,74$ ; mediana de 0 (variação de -51 a 65). L. Associação do  $FEF_{25-75\%}$  à variante rs4073, modelo dominante e grupo *RTFC-A* ( $p=0,029$ ;  $p^c=0,100$ ). (AA + AT)  $n=82$ ; média de  $15,48 \pm 27,20$ ; mediana de 15 (variação de -40 a 117). (TT)  $n=33$ ; média de  $5,94 \pm 27,33$ ; mediana de 0 (variação de -51 a 76). M. Associação do  $FEF_{25-75\%}$  à variante rs4073, modelo recessivo e grupo *RTFC-B* ( $p=0,047$ ;  $p^c=0,063$ ). (AA)  $n=9$ ; média de  $25,78 \pm 23,14$ ; mediana de 30 (variação de -21 a 57). (AT + TT)  $n=50$ ; média de  $11,56 \pm 27,89$ ; mediana de 8 (variação de -51 a 117). O ponto corresponde aos valores medianos e a barra corresponde a intervalo de confiança de 95%.

RTFC-B mostrou menor resposta a BD (fig. 1B). Por fim, nos pacientes dos grupos RTFC-A e RTFC-B, respectivamente, o genótipo AA (modelo recessivo) para rs4073 mostrou maior resposta a BD para FEF<sub>75%</sub> (fig. 1I) e FEF<sub>25-75%</sub> (fig. 1M).

A distribuição de haplótipos para as variantes do gene da *IL-8* é apresentada na tabela 3.

Para comparação entre as variantes do gene da *IL-8* e a resposta a BD definida como aumento de > 12% e 200 mL de VEF1 inicial, não foi encontrada associação positiva ( $p > 0,05$ ).

## Discussão

Mostramos anteriormente a influência das diferentes variantes do gene da *IL-8* sobre a gravidade clínica da FC.<sup>22</sup> Além disso, este estudo mostra a associação das diferentes variantes do gene da *IL-8* e sua modulação à resposta a BD, avalia o impacto do medicamento sobre a função pulmonar. A variabilidade das respostas aos BD é determinada por vários fatores, como inflamação e obstrução

**Tabela 3** Distribuição de genótipos, alelos e haplótipo das variantes do gene da *IL-8* (rs4073, rs2227306 e rs2227307) em pacientes com fibrose cística

Variantes	Genótipo	Número (%)	Alelo	Número (fa)	$\chi^2$	Valor de p <sup>a</sup>
rs4073	AA	54 (29,2)	A	187 (0,51)	3,94	< 0,05
	AT	79 (42,7)	T	183 (0,49)		
	TT	52 (28,1)	Total	370		
	Total	185				
rs2227306	CC	70 (38)	C	211 (0,57)	8,21	< 0,05
	CT	71 (38,6)	T	157 (0,43)		
	TT	43 (23,4)	Total	368		
	Total	184				
rs2227307	GG	31 (17,4)	G	139 (0,39)	1,48	> 0,05
	TG	77 (43,3)	T	217 (0,61)		
	TT	70 (39,3)	Total	356		
	Total	178				
rs4073/rs2227306/rs2227307		Frequência	Percentual (%)			
AA CC GG		3	1,7			
AA CC GT		5	2,8			
AA CC TT		24	13,6			
AA CT GG		3	1,7			
AA CT GT		4	2,3			
AA CT TT		7	4,0			
AA TT GG		2	1,1			
AA TT GT		2	1,1			
AA TT TT		3	1,7			
AT CC GT		13	7,3			
AT CC TT		7	4,0			
AT CT GT		30	16,9			
AT CT TT		10	5,6			
AT TT GG		5	2,8			
AT TT GT		6	3,4			
AT TT TT		3	1,7			
TT CC GG		2	1,1			
TT CC GT		5	2,8			
TT CC TT		8	4,5			
TT CT GG		4	2,3			
TT CT GT		6	3,4			
TT CT TT		3	1,7			
TT TT GG		12	6,8			
TT TT GT		5	2,8			
TT TT TT		5	2,8			
Total		177	100			

fa, frequência absoluta; *IL-8*, interleucina 8; %, percentual;  $\chi^2$ , qui-quadrado.

<sup>a</sup>  $\chi^2$  e valores de p fazem referência ao cálculo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados significativos são mostrados em negrito. Houve uma fraca correlação entre as variantes do gene da *IL-8* nos pacientes com fibrose cística inscritos no estudo. Não há desequilíbrio de ligação.



pulmonar,<sup>23</sup> bactérias<sup>24</sup> e sintomas pulmonares,<sup>25</sup> bem como genes modificadores.<sup>26</sup> Contudo, até agora, nenhum estudo investigou o papel da *IL-8* como mediador pró-inflamatório de FC e sua relação aos BD e se as variantes do gene da *IL-8* podem explicar a resposta individual aos BD na FC. Acredita-se que os beta-2 agonistas de curta e longa duração podem ser benéficos para pacientes com FC e com hiperresponsividade brônquica positiva.<sup>6</sup>

Em doenças pulmonares progressivas, foram avaliados diferentes marcadores e o uso dos BD parece fornecer melhor resposta ao FEF<sub>25-75%</sub>, em comparação com outros marcadores, o que indica envolvimento de vias aéreas de menor calibre na FC.<sup>27</sup> Nosso estudo, em concordância com a literatura de referência, encontrou uma associação da variante rs4073 para o marcador FEF<sub>25-75%</sub> nos modelos dominante (para os grupos *RTFC-A* e *RTFC-B*), codominante (grupo *RTFC-B*) e recessivo (grupo *RTFC-B*). Houve melhoria em diversos outros marcadores de espirometria para rs4073, como VEF<sub>1</sub>, VEF<sub>1</sub>/CVF e FEF<sub>50%</sub> e FEF<sub>75%</sub>, o que mostra impacto sobre os padrões de respiração dos pacientes.

O estudo de Hillian et al. encontrou uma associação das variantes rs2227307 e rs4073 do gene da *IL-8* e a gravidade da doença pulmonar.<sup>28</sup> Nesse estudo, os pacientes foram divididos em duas coortes: (1) pacientes homocigotos F508del; (2) pacientes com outros genótipos do gene do *RTFC*. Na coorte 1, as variantes rs4073, rs2227306 e rs2227543 não foram associadas a doença pulmonar e a variante rs2227307 mostrou associação, independentemente do sexo. Na coorte 2, as variantes rs4073 e rs2227306 foram associadas a gravidade da doença pulmonar em homens. Assim, o sexo do paciente, o genótipo do gene do *RTFC* e os genes modificadores podem modular a gravidade da doença pulmonar.<sup>28</sup> Nesse estudo, o genótipo rs2227307 não teve impacto sobre a variabilidade da resposta a BD. Isso sugere que, apesar de esse genótipo estar associado a doença pulmonar em pacientes homocigotos F508del, sua resposta a BD não é relevante.

O alvo dos BD é a proteína ADRB2, expressa no músculo liso das vias aéreas. As variantes de ADRB2 estão associadas à resposta à medicação. Essa proteína foi amplamente estudada em asma e ainda muito raramente em FC. A eficácia da resposta a BD e aos corticosteroides inalatórios no manejo de inflamação das vias aéreas em asma está confirmada e depende das variantes Arg16Gly (rs1042713; c.46A>G) e Glu27Gln (rs1042714; c.79C>G) do gene *ADRB2*.<sup>[29]</sup> A variante Gln27Glu concede resistência à proteína ADRB2 na resposta a BD. Os alelos 46\*G e 79\*G protegem contra asma, reduzem o risco em 27%.<sup>29</sup> As variantes do alelo G induzem alterações na regulação do receptor, devido ao aumento da susceptibilidade à degradação de proteínas. Este estudo constatou que as variantes Arg16Gly e Gln27Glu do gene *ADRB2* influenciam a respostas aos BD na FC. Na espirometria e em outros marcadores de gravidade, a variante Arg16Gly mostrou associação positiva, ao contrário da variante Gln27Glu. O genótipo Arg/Arg da variante Arg16Gly foi associado a melhores valores de VEF<sub>1</sub> e FEF<sub>25-75%</sub>. A resposta a BD nas análises de haplótipo foi positiva na ausência dos genótipos Gly16Gly e Glu27Glu para a proporção VEF<sub>1</sub>/CVF.

As variantes de ADRB2, capacidade de difusão dos pulmões para monóxido de carbono, condutância da membrana capilar alveolar, volume sanguíneo na capilar alveolar e SaO<sub>2</sub>, foram avaliadas na resposta a BD em 18 pacientes e 20 controles saudáveis, antes e depois da administração de

salbutamol (30, 60 e 90 minutos). Os indivíduos saudáveis não apresentaram alterações nos marcadores avaliados para a variante Glu27Glu. Contudo, na FC, essa variante influenciou a resposta a BD: a melhor resposta encontrada na presença de pelo menos um alelo 27Glu. Houve uma diferença de difusão pulmonar e SaO<sub>2</sub> periférica de acordo com a variação do gene *ADRB2* na posição 27 e a dosagem do medicamento deve ser prescrita de acordo com essa variação.<sup>30</sup>

A maior parte dos estudos foca nas variantes do gene *ADRB2* na resposta a BD. Contudo, este estudo demonstra que, mesmo indiretamente, as variantes do gene da *IL-8* e possivelmente em outros genes, que modulam a resposta pulmonar inflamatória, podem potencializar ou diminuir o efeito dos BD e, ainda, influenciar a resposta ao medicamento.

Com relação ao HWE, conforme discutido anteriormente por nosso grupo,<sup>22</sup> duas variantes (rs4073 e rs2227306) não estavam em equilíbrio. Devemos lembrar que o HWE pressupõe uma população ideal, sem a interferência de fatores evolucionários. Contudo, em genes envolvidos em controle de imunidade, inflamação e infecção, o desequilíbrio do HWE parecer estar associado de forma secundária aos mecanismos de seleção que favoreceram um alelo específico que pode trazer uma resposta mais efetiva. O desequilíbrio não invalida o estudo de associação, pois os grupos fazem parte da mesma população.

Limitações do estudo: (i) banco de dados transversal (a resposta a BD foi avaliada em um único momento); (ii) há vários dados ausentes, se levarmos em consideração os problemas para obter as informações nos registros; (iii) caso a resposta a BD seja diferente com base no VEF<sub>1</sub> de base, principalmente em indivíduos saudáveis; (iv) possíveis variáveis de confusão com relação aos resultados, como gravidade da doença, terapias atuais, adesão à medicação e esforço adequado no teste de função pulmonar.

As variantes do gene da *IL-8* (rs2227306 e especialmente rs4073) podem estar associadas à resposta a BD durante a espirometria. Esse medicamento pode ser uma opção para o tratamento da doença, na maior parte do tempo em pacientes com vias aéreas de menor calibre. Devem-se conduzir estudos que envolvam dose e combinações de medicamentos para determinar o melhor tratamento de acordo com o genótipo do paciente com FC, o gene do *RTFC*, bem como os genes modificadores.

## Financiamento

FALM: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), em apoio às pesquisas n° 2011/12939-4, n° 2011/18845-1, n° 2015/12183-8 e n° 2015/12858-5; Fundo de Apoio à Pesquisa, ao Ensino e à Extensão da Universidade Estadual de Campinas, em apoio à pesquisa n° 0648/2015; JDR: Fapesp, em apoio às pesquisas n° 2011/18845-1 e n° 2015/12183-8. LLF: Fapesp, em apoio à pesquisa n° 2013/19052-0.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

Luciana Montes Rezende, Luciana Cardoso Bonadia e Stephanie Villa-Nova por seu apoio técnico durante a extração do DNA e na identificação de mutações do gene do *RTFC*. Marcela Augusta de Souza Pinhel, Michele Lima Gregório, Rafael Fernandes Ferreira, Graciele Domitila Tenani e Heloisa Cristina Caldas por seu apoio técnico na padronização da genotipagem da *IL-8*. Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro por fazer os testes de função pulmonar (LAFIP/Ciped/Unicamp). Rafaella Maionchi Pereira Martins por seu apoio técnico na determinação dos escores clínicos. Maria de Fátima Corrêa Pimenta Servidoni por promover um elo entre ambas as universidades.

## Referências

- Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in *ADRB2* gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2012;12:50–9.
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*. 2002;1:13–29.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 1994;56:559–64.
- Halfhide C, Evans HJ, Couriel J. Inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;19:CD003428.
- Gangell CL, Hall GL, Stick SM, Sly PD, Arest CF. Lung function testing in preschool-aged children with cystic fibrosis in the clinical setting. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45:419–33.
- Halfhide C, Evans HJ, Couriel J. WITHDRAWN: inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2:CD003428.
- Barnes PJ. Biochemical basis of asthma therapy. *J Biol Chem*. 2011;286:32899–905.
- Maurya N, Awasthi S, Dixit P. Association of *CFTR* gene mutation with bronchial asthma. *Indian J Med Res*. 2012;135:469–78.
- Regamey N, Tsartsali L, Hilliard TN, Fuchs O, Tan HL, Zhu J, et al. Distinct patterns of inflammation in the airway lumen and bronchial mucosa of children with cystic fibrosis. *Thorax*. 2012;67:164–70.
- Lima CS, Ortega MM, Marson FAL, Zulli R, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. *CFTR* mutations and *GSTM1* and *GSTT1* deletions in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Bras Pneumol*. 2012;38:50–6.
- Marson FA, Bertuzzo CS, Hortencio TD, Ribeiro JD, Bonadia LC, Ribeiro AF. The *ACE* gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2012;12:41.
- Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in the glutathione pathway modulate cystic fibrosis severity: a cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2014;15:27.
- Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Personalized drug therapy in cystic fibrosis: from fiction to reality. *Curr Drug Targets*. 2015;16:1007–17.
- Polgar G, Promadhat V. Pulmonary function testing in children: techniques and standards. Philadelphia (PA): WB Saunders Company; 1971.
- Pereira CA, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33:397–406.
- Duarte AA, Pereira CA, Rodrigues SC. Validation of new Brazilian predicted values for forced spirometry in Caucasians and comparison with predicted values obtained using other reference equations. *J Bras Pneumol*. 2007;33:527–35.
- Bonadia LC, Marson FA, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF, et al. *CFTR* genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene*. 2014;540:183–90.
- Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within *IL-8* on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:671–6.
- Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Sogumo PM, et al. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet*. 2011;49:292–302.
- Faul F, Erdfelde E, Lang AG, Buchner A. GPower 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175–91.
- Benjamini Y. Discovering the false discovery rate. *J R Stat Soc Ser B (Stat Method)*. 2010;72:405–16.
- Furlan LL, Marson FA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Salomão Junior JB, Souza DR. *IL8* gene as modifier of cystic fibrosis: unraveling the factors which influence clinical variability. *Hum Genet*. 2016;135:881–94.
- Park HY, Lee H, Koh W, Kim S, Jeong I, Koo HK, et al. Association of blood eosinophils and plasma periostin with FEV1 response after 3-month inhaled corticosteroid and long-acting beta2-agonist treatment in stable COPD patients. *Int J Chronic Obstruct Pulm Dis*. 2016;11:23–30.
- Shaw JG, Vaughan A, Dent AG, O'Hare PE, Goh F, Bowman RV, et al. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis*. 2014;6:1532–47.
- Dunn RM, Lehman E, Chinchilli VM, Martin RJ, Boushey HA, Israel E, et al. Impact of age and sex on response to asthma therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:551–8.
- Duan QL, Lasky-Su J, Himes BE, Qiu W, Litonjua AA, Damask A, et al. A genome-wide association study of bronchodilator response in asthmatics. *Pharmacogenomics J*. 2014;14:41–7.
- Muramatu LH, Stirbulov R, Forte WC. Pulmonary function parameters and use of bronchodilators in patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2013;39:48–55.
- Hillian AD, Londono D, Dunn JM, Goddard KA, Pace RG, Knowles MR, et al. Modulation of cystic fibrosis lung disease by variants in interleukin-8. *Genes Immun*. 2008;9:501–8.
- Thakkinstian A, McEvoy M, Minelli C, Gibson P, Hancox B, Duffy D, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between  $\beta$ 2-adrenoceptor polymorphisms and asthma: a HuGE review. *J Epidemiol*. 2005;162:201–11.
- Traylor BR, Wheatley CM, Skrentny TT Jr, Foxx-Lupo WT, Phan H, Patanwala AE, et al. Influence of genetic variation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor on lung diffusion in patients with cystic fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24:610–6.