



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUANA GAVIOLI DOS SANTOS

**Identificação de Variantes de Nucleotídeo Único no Gene *SLC26A9* em
Pacientes com Fibrose Cística (Homozigotos p.Phe508del) e sua Associação à
Resposta Orkambi® (Lumacaftor e Ivacaftor) *in vitro***

CAMPINAS

2023

LUANA GAVIOLI DOS SANTOS

Identificação de Variantes de Nucleotídeo Único no Gene *SLC26A9* em Pacientes com Fibrose Cística (Homozigotos p.Phe508del) e sua Associação à Resposta Orkambi® (Lumacaftor e Ivacaftor) in vitro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: Fernando Augusto de Lima Marson

COORIENTADOR: Taís Nitsch Mazzola

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA LUANA GAVIOLI DOS SANTOS, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Santos, Luana Gavioli dos, 1994-
Sa59i Identificação de variantes de nucleotídeo único no Gene SLC26A9 em
pacientes com fibrose cística (homozigotos p.Phe508del) e sua associação à
resposta Orkambi (Lumacaftor e Ivacaftor) *in vitro* / Luana Gavioli dos Santos. –
Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Fernando Augusto de Lima Marson.
Coorientador: Taís Nitsch Mazzola.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. Modulador CFTR. 3. Genes modificadores. 4.
Orkambi. 5. Proteína SLC26A9 humana. I. Marson, Fernando Augusto de Lima,
1985-. II. Mazzola, Taís Nitsch, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Identification of single nucleotide variants in SLC26A9 gene in
patients with cystic fibrosis (p.Phe508del homozygous) and its association to Orkambi
(Lumacaftor and Ivacaftor) response *in vitro*

Palavras-chave em inglês:

Cystic fibrosis
CFTR modular drugs
Modifier genes
Orkambi
SLC26A9 protein, human

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Fernando Augusto de Lima Marson [Orientador]
Mônica de Cássia Firmida
Maria Carolina Pedro Athié

Data de defesa: 31-05-2023

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0008-3034-1131>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6146162987328911>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUANA GAVIOLI DOS SANTOS

ORIENTADOR: Fernando Augusto de Lima Marson

COORIENTADOR: Taís Nitsch Mazzola

MEMBROS:

1. PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON

2. PROFA. DRA. MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

3. PROFA. DRA. MARIA CAROLINA PEDRO ATHIÉ

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 31/05/2023

*Ao meu marido Jefferson e aos meus filhos Bernardo e Philipe,
Obrigado meus amores por acreditarem nos meus sonhos e me ajudarem a torná-los
realidade. Ser reconhecida como cientista pelas pessoas é bacana, mas ver o
orgulho e o brilho nos olhos de vocês meus amores dizendo “Você é uma cientista,
mãe” é o que me move. Eu amo vocês e todas as lutas são válidas porque serão
sempre por vocês.*

*A minha amiga e coorientadora Taís,
Obrigado por me apoiar, por segurar em minhas mãos e não me deixar desistir.*

*A comunidade científica, os pacientes e seus familiares,
Apesar dos pesares, nós nunca desistiremos da ciência e da vontade de cuidar dos
pacientes.*

AGRADECIMENTOS

Como bem diz a pesquisadora Carolina Lincoln, ao qual tenho a honra de dividir histórias, *“Este trabalho resume bem a máxima de que sozinho não fazemos nada”*. Assim sendo,

Agradeço primeiramente a Deus, por me sustentar até aqui. Sei que nenhum sonho é colocado em nosso coração sem o propósito dele e, apesar de todos os percalços no meio dessa caminhada, aqui estamos.

Agradeço aos meus pais, Dirceu e Rosa, obrigado por mesmo sem entenderem bem o meu amor pelos estudos me mostrarem que o melhor caminho era o conhecimento, a humildade e o respeito. À minha irmã Giovana, minha pequena gigante, “culpada” pelo meu amor à ciência e à genética. Minha linda, você veio para nos iluminar e nos mostrar que “especial” é ter você conosco todos os dias. A vocês, minha família, minha eterna gratidão por tudo que fazem por mim.

... ao meu parceiro de vida, Jefferson, obrigada, meu amor, por estar sempre do meu lado, por partilhar a vida comigo e por juntos formarmos essa família linda.

... aos meus meninos, Bernardo e Philipe, meus amores, vocês são o meu motivo de vida. Mamãe ama vocês.

... às minhas tias, Geni e Elenice, por sempre me apoiarem e serem minhas referências de profissionais. Se escolhi a área da saúde e da educação, foi por influência de vocês.

... aos meus sogros e sogras, José, João, Cida e Fátima, obrigada pelo carinho e cuidado comigo. Especialmente agradeço à minha sogra Cida que fez questão de pagar meu inglês para poder entrar no mestrado, minha eterna gratidão.

... aos meus cunhados, João Vitor e Maria Vitória, por tornarem meus dias mais engraçados e pelas conversas calorosas sobre tantos assuntos.

... à minha grande família do coração, tias Direz e Nana, minha comadre, prima e amiga Ray, sem o apoio de vocês nada teria dado certo. Obrigada por segurarem

as pontas com os meninos sempre que puderam para que eu pudesse estudar e trabalhar.

... à minha amiga, professora de inglês e inspiração de pesquisadora, Giselle, minha ruiva, serei eternamente grata a tudo que fez, faz e sei que ainda fará por mim e pelos meninos. Obrigada pela parceria de sempre e pelas melhores aulas do mundo.

... à minha OHANA - Vitor, Pablo, Má, Aline, Gabi, Ana, Tami, Andrew, Carol, Dê e Mika, o que seria de mim nesse último ano se não fossem vocês, obrigada pelas inúmeras conversas, pelas trocas de informações e conhecimentos, por estarem sempre dispostos a me ouvir, por segurarem a barra comigo em cada crise de ansiedade. Vocês são mais que meus colegas de trabalho, somos uma família.

... às amigas da bio014D, Bah, Aline, Malu, Erika, Nika, por esses 9 anos de amizade e companheirismo.

... à “minha pessoa”, minha melhor amiga há dez anos, meu chaveirinho, minha nega brava, Suellen, obrigada por ser você sempre. Não há palavras que expressem o meu amor e carinho por você e por sua família. Estaremos sempre juntas (não adianta fugir de mim, o destino sempre nos une novamente).

... à minha filha da bio, vizinha, amiga e companheira de surtos coletivos (rsrsrs), Lizandra, minha pequena, quão grande você é, que pesquisadora incrível, pessoa de fé e luz. Obrigada pelos conselhos, por surtar comigo e, em 5 minutos, dizer que tudo ficará bem. Que Deus ilumine teus passos.

... à minha turma do CBMEG, professoras Maricilda, Edi e Mara, Regi, Helena, Débora, Cris, Nadya, Laiz, João, obrigada pela oportunidade de começar minha vida acadêmica ao lado de vocês, pessoas maravilhosas e pesquisadores incríveis.

... aos colegas do laboratório de Genética Humana da FCM, em especial Jaque, Dani, Tânia, Estela, João, Jonathan, Eimy, obrigada pelo carinho, por estarem sempre dispostos a me ensinar e tornar esse período de experimentos durante a pandemia o mais tranquilo possível.

... à equipe multidisciplinar da Fibrose Cística, especialmente Dr. Dirceu, Dr. Fernando, Dra. Eulália, Dr. Marcelo, Dra. Carmen, Stephanie, Arthur, Aline, vocês, cada qual à sua maneira e período em que estivemos juntos, me apresentaram o

verdadeiro significado de “cuidado e respeito com os pacientes”. É um orgulho imenso fazer parte dessa equipe.

... aos funcionários do laboratório LICRI, Andrey e Dioze, e ao professor Mário Saad, pela disponibilidade de vocês e pelo uso do equipamento de sequenciamento.

... às funcionárias Patrícia e Luciana, por todo suporte técnico, físico e mental. Em especial a minha querida Lu e nossa pequena Rafa, *in memoriam*, obrigada por dividir comigo o prazer de viver ao lado dela. Rafa foi um anjo que veio iluminar a vida de todos que a conheceram e hoje sei que cuida de nós lá em cima. Eu te amarei para toda minha vida, minha pequena joaninha.

... a toda a equipe do ProFis, obrigado pela oportunidade de fazer parte da universidade pública, sem esse programa, eu não estaria aqui. Hoje temos mais uma aluna oriunda de escola pública da periferia de Campinas erguendo um diploma em uma das melhores universidades do mundo.

... ao meu IB, como amo esse espaço, em estar pelas mesinhas e corredores, pelas trocas de resumos pré provas e pelo descanso depois de horas de estudos. Aos professores da bio014D cada um de vocês possui um lugarzinho muito especial no meu coração.

... minha amiga, parceira de anos e de maternidades (rsrsrs), que tenho o prazer de chamar de co orientadora, Taís, não há palavras que possam expressar o meu amor, meu carinho, minha admiração e gratidão por tudo que você e sua família já fizeram, fazem e sei que ainda farão por mim e pelos meus familiares. Que nossa parceria seja para todo o sempre e que Deus continue te conservando assim, uma “moleca”.

... ao meu orientador, Fernando, querido, primeiramente quero lhe agradecer por ter me acolhido e aberto sua vida para que eu fizesse parte desse amor que você tem pela pesquisa e pela Fibrose Cística, por ser sempre tão paciente e ao mesmo tempo por ter “puxado minha orelha” sempre que foi preciso. É um orgulho dizer que sou sua aluna, tanto pela pessoa que você é como pelo exemplo de profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*"It's a beautiful day to save lives!"
(Derek Sheppard – Grey's Anatomy)*

*De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!*
(Fernando Sabino – Trecho adaptado de O encontro Marcado)

RESUMO

Introdução: Embora seja uma doença monogênica autossômica e recessiva, apenas as alterações no gene *CFTR* não são capazes de explicar a variabilidade fenotípica, incluindo, a resposta individual aos fármacos moduladores da Fibrose Cística (FC), como o Orkambi®. Desta forma, nosso grupo de pesquisa vem descrevendo o papel de genes modificadores no fenótipo dessa doença. Por ser um canal de cloreto alternativo, estar expresso no epitélio celular dos órgãos afetados pela FC e ser descrito como funcionalmente associado ao canal *CFTR*, o objetivo deste estudo foi rastrear *Single Nucleotide Variants* (SNVs) no gene *Solute Carrier Family 26, member 9* (*SLC26A9*) em busca de possíveis novos alvos terapêuticos para a medicina de precisão e personalizada. **Métodos:** O sequenciamento de Sanger para os éxons codificantes, região 3'UTR e regiões limítrofes íntron-exon do gene *SLC26A9* foi realizado em nove pacientes homozigotos para o alelo p.Phe508del do *CFTR*. As variantes encontradas foram avaliadas por ferramentas de predição *in silico*. A função do canal *CFTR* foi avaliada por corrente estimulada por cAMP (Δ Isc-eq-FSK) em células epiteliais nasais polarizadas dos pacientes e cultivadas em câmaras de micro-Ussing com o Orkambi®. **Resultados:** Identificamos 30 variantes no gene *SLC26A9*, sendo 24 intrônicas, três na região exônica (variantes *missense*: rs74146719 e rs16856462, e uma sinônima rs33943971) e três na região 3'UTR. De acordo com as diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics*, vinte variantes foram classificadas como benignas e as demais foram consideradas de significado incerto. Em relação às predições *in silico*, algumas variantes apresentaram predições deletérias ou com possíveis alterações no sítio de *splicing*, mas a maioria foi prescrita como benigna ou neutra. Não houve diferenças significativas entre genótipos e alelos para todas as 30 variantes no gene *SLC26A9* em relação ao Δ Isc-eq-FSK mediante a resposta ao Orkambi®. **Conclusões:** Analisando os pacientes homozigotos para o alelo p.Phe508del do gene *CFTR*, não encontramos nenhuma variante patogênica no gene *SLC26A9*. Também não constatamos associações entre as 30 variantes do gene *SLC26A9* e a resposta ao Orkambi® *in vitro*.

Palavras-Chave: Fibrose cística; Modulador *CFTR*; Genes modificadores; Orkambi®; Proteína *SLC26A9* humana.

ABSTRACT

Background: Since patients with cystic fibrosis with different Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (*CFTR*) genotypes present a wide response variability for modulator drugs such as Orkambi®, it is important to screen variants in candidate genes with an impact on precision and personalized medicine, such as Solute Carrier Family 26, member 9 (*SLC26A9*) gene. **Methods:** Sanger sequencing for the exons and intron-exon boundary junctions of the *SLC26A9* gene was employed in nine individuals with p.Phe508del homozygous genotype for the *CFTR* gene who were not under *CFTR* modulators therapy. The sequencing variants were evaluated by *in silico* prediction tools. The *CFTR* function was measured by cAMP-stimulated current (ΔI_{sc} -eq-FSK) in polarized *CFTR* of human nasal epithelial cells cultured in micro-Ussing chambers with Orkambi®. **Results:** We found 24 intronic variants, three in the coding region (missense variants - rs74146719 and rs16856462 and synonymous - rs33943971), and three in the three prime untranslated region (3' UTR) region in the *SLC26A9* gene. Twenty variants were considered benign according to American College of Medical Genetics and Genomics guidelines, and ten were classified as uncertain significance. Although some variants had deleterious predictions or possible alterations in splicing, most predictions were benign or neutral. When we analyzed the ΔI_{sc} -eq-FSK response to Orkambi®, there were no significant differences within the genotypes and alleles for all 30 variants in the *SLC26A9* gene. **Conclusions:** Among the nine individuals with p.Phe508del homozygous genotype for the *CFTR* gene, no pathogenic *SLC26A9* variants were found, and we did not detect associations from the 30 *SLC26A9* variants and the response to the Orkambi® in vitro.

Keywords: Cystic Fibrosis; *CFTR* Modulator Drugs; Modifier Genes; Orkambi®; *SLC26A9*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Caracterização da fibrose cística	14
1.2 Gene <i>CFTR</i>	15
1.2.1 Caracterização e classes de mutações do gene <i>CFTR</i>	15
1.2.2 Proteína CFTR: estrutura e função	17
1.3 Manifestações clínicas	18
1.3.1 Manifestações pulmonares na FC	18
1.3.2 Manifestações extra-respiratórios	19
1.4 FC: Medicina personalizada e medicina de precisão versus genes modificadores... ..	20
1.5 Drogas moduladoras da fibrose cística	21
1.6 Genes modificadores.....	22
1.6.1 Gene <i>SLC26A9</i>	22
 2. OBJETIVOS.....	 24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
 3. MÉTODOS	 25
3.1 Pacientes e critérios de inclusão	25
3.2 Triagem de variantes no gene <i>SLC26A9</i>	26
3.2.1 Padronização das reações em cadeia de polimerase (PCR) e amplificação dos fragmentos	26
3.2.2 Reação de sequenciamento.....	28
3.2.3 Análise das sequências obtidas	29
3.3 Classificação das variantes... ..	29

3.3.1 Banco de dados.....	29
3.3.2 Estudos <i>in silico</i>	29
3.4 Resposta do canal CFTR a droga Orkambi®.....	31
3.5 Análise estatística	32
4. RESULTADOS.....	33
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFÊRENCIAS.....	49

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Caracterização da fibrose cística

Historicamente, suspeita-se que a fibrose cística (FC; OMIM #219700) seja referenciada num provérbio irlandês do final do século XV, dizendo “*Ai daquela criança que, quando beijada na testa, tem gosto de sal. Ele está enfeitiçado e logo morrerá*”, relacionando que as crianças que apresentavam essas condições teriam sido enfeitiçadas e morriam por essa causa. Foi, provavelmente, em 1595 que se iniciou as primeiras descrições patológicas da FC por anatomistas e médicos em diversos países, por meio de autópsias de crianças ou recém-nascidos com características de desnutrição, pâncreas endurecidos com aparência cirrótica ou alterações no intestino delgado, relatando os primeiros casos de íleo meconial muito comum em pacientes com FC. Apesar de tantos anos de descrições de casos, o termo “Fibrose Cística” surgiu apenas em 1936 com o trabalho do pediatra suíço Guido Fanconi von Grebel (1892-1979; Pochiavo, Suíça), associando a insuficiência pancreática exócrina à doença pulmonar crônica em crianças. Dois anos depois, a patologista Dorothy Hansine Andersen (1901-1963; Carolina do Norte, EUA) descreveu a doença e suas alterações histológicas no pâncreas e, finalmente, o oncologista infantil Sydney Farber (1903-1973; Nova York, EUA) especulou que não se tratava de um problema apenas no pâncreas, mas sim uma produção de muco generalizada, criando o termo “mucoviscidose”^{1,2}.

A FC é uma doença genética monogênica de padrão autossômico recessivo³, que ocorre com maior frequência em populações caucasianas⁴. Em todo o mundo a FC afeta mais de 90.000 indivíduos⁵. Os registros da *European Cystic Fibrosis Society* incluem dados de mais de 52 mil pessoas com FC nos países participantes presentes em toda a Europa⁶. Já no Brasil, cerca de 6.000 pacientes estão cadastrados no Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) de acordo com seu último relatório⁷.

A FC é causada por variantes patogênicas no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR; OMIM #602421), que codifica a proteína de mesmo nome, responsável pela formação do canal transportador de íons presente

nas superfícies apicais de células em diversos órgãos⁸⁻¹⁰. Assim, a FC é uma doença que afeta múltiplos órgãos e sistemas, que leva, principalmente, ao aumento da concentração de eletrólitos no suor, doença respiratória com infecções recorrentes, íleo meconial, insuficiência pancreática e diabetes relacionada à FC. Apesar disso, a morbidade e mortalidade da doença são determinadas principalmente pela doença pulmonar obstrutiva crônica^{4,11,12}. Embora a FC já tenha sido considerada intratável e mortal durante a infância, o diagnóstico precoce durante a triagem neonatal tem elevado a sobrevida da maioria dos pacientes até a idade adulta¹³.

1.2 Gene *CFTR*

1.2.1 Caracterização e classes de mutações do gene *CFTR*

Identificado em 1989, o gene *CFTR* está localizado no braço longo do cromossomo 7⁸⁻¹⁰, posição 7q31.2 possuindo aproximadamente 190 kb com 27 éxons, codificando um canal de cloreto expresso na membrana das células epiteliais¹².

Das mais de 2000 variantes encontradas no gene *CFTR*, mais de 400 são descritas como causadoras da FC, além de variantes que possuem significado desconhecido ou que não alteram o fenótipo do indivíduo^{14,15}. As ferramentas *in silico* podem ser utilizadas para predição das consequências causadas por essas alterações enquanto não são confirmadas *in vivo*⁵.

As variantes patogênicas do gene *CFTR* são tradicionalmente classificadas em seis classes de acordo com seu papel patogênico e impacto na função da proteína^{12,16}, variando desde ausência total da produção da proteína até uma estabilidade anormal da mesma na membrana plasmática^{17,18}. Essa disfunção protéica resulta em uma má condução do fluxo de íons nas superfícies celulares, alterando a hidratação e o pH do líquido da superfície das vias aeríferas que, juntamente com o excesso de produção de muco, resulta em um acúmulo desse muco de viscosidade aumentada levando a ciclos recorrentes de infecção e inflamação, além da obstrução e destruição dos tecidos do trato brônquico e digestivo^{12,19}.

Embora o sistema de classificação tradicional classifica as variantes do gene *CFTR* em seis classes, De Boeck e Amaral (2016) dividiram as variantes tradicionais de classe I em duas classes. A classe I seria composta por variantes de *stop-codon*, enquanto as variantes que levam a não transcrição do RNAm fariam parte de uma

nova classe, a classe VII. As duas classes são compostas por variantes com o mesmo resultado fenotípico, ou seja, ausência da proteína CFTR, mas as variantes de classe VII não podem ser resgatadas por terapia corretiva com drogas moduladoras. Sendo assim, Marson e colaboradores (2016) propuseram em seu trabalho uma nova ordem na classificação das classes de mutações, levando em consideração a combinação do defeito na proteína CFTR, as terapias corretivas e suas características clínicas associadas. As variantes de classe VII relacionadas aos RNAm não transcritos não tendo, portanto, uma terapia corretiva, foram reordenadas em classe IA. Seguidas pelas variantes de *stop-codon* alocadas como classe IB, e as demais classes de II à VI permaneceram inalteradas^{20,21}.

- ✓ **Classe IA:** são as variantes classificadas como *nonsense*, *frameshift* ou *splice-site* onde não há a síntese de transcritos do RNAm, sendo intratáveis devido à falta de terapia corretiva disponível^{4,5,21,22}.
- ✓ **Classe IB:** são as variantes de *stop-codon*, que introduzem códons de parada prematuramente impedindo a produção da proteína CFTR completa^{21,22}.
- ✓ **Classe II:** são as variantes que causam o processamento da proteína CFTR de maneira inadequada ou um mal dobramento dela, não atingindo assim a estabilidade no retículo endoplasmático, posteriormente, não trafegando até a membrana plasmática. Desta forma, a proteína é degradada prematuramente pelos proteossomas. A variante mais comum no gene *CFTR* faz parte dessa classe, sendo responsável por aproximadamente 70% dos alelos do CFTR: a deleção de uma fenilalanina na posição 508 (p.Phe508del) causa o mal dobramento do canal, desestabilizando a proteína, e levando-a a degradação pelos mecanismos de controle de qualidade celular^{5,22,23}.
- ✓ **Classe III:** nesta classe de mutações, embora a proteína tenha seu comprimento total e esteja presente na membrana plasmática, ocorrem defeitos de ativação/*gating* do canal proteico. Faz parte dessa classe a variante p.Gly551Asp^{5,22}.
- ✓ **Classe IV:** são variantes patogênicas que afetam a condutância do cloreto através dos poros do canal CFTR, sendo uma classe que possui variantes de maior raridade^{5,22}.

- ✓ **Classe V:** é a classe de variantes que promove uma redução do número de proteínas CFTR funcionais devido à sua síntese ou maturação ineficiente. Resultam de defeitos de *splicing* ou por conta de variantes *missense*. As proteínas CFTRs produzidas por essas variantes funcionam normalmente^{5,22}.
- ✓ **Classe VI:** são variantes que produzem uma redução na estabilidade da proteína CFTR na membrana plasmática, resultando em aumento da endocitose e degradação pelos lisossomos, com redução da quantidade de proteínas funcionais na membrana da superfície celular^{5,22}.

Apesar da correlação entre a classe de variantes do gene *CFTR* e gravidade clínica, os indivíduos com FC podem carregar variantes de diferentes classes em seus dois alelos, levando a milhares de combinações possíveis no genótipo do gene *CFTR* condizente com a ampla variabilidade fenotípica da FC⁵.

1.2.2 Proteína CFTR: estrutura e função

Formada por 1480 aminoácidos, essa glicoproteína de membrana pertence à família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Sua organização se dá em cinco domínios: dois domínios transmembranares (TMD1 e TMD2), dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2) e um domínio regulador (RD)^{24,25}.

O domínio TMD1 está ligado ao NBD1 e o TMD2 está ligado ao NBD2, formando dois complexos TMD-NBD então ligados entre si pelo domínio RD. Os poros do canal por onde os ânions são conduzidos são formados pelos domínios TMDs que atravessam a bicamada fosfolipídica da membrana e são conectados por alças tanto extracelulares quanto intracelulares. Já os domínios NBDs são os responsáveis pela regulação da abertura e fechamento desses canais^{24,25}.

Sendo um canal iônico dependente de ATP, sua abertura é dada pela fosforilação no domínio RD pela proteína quinase A enquanto o ATP se liga aos domínios NBDs levando à sua dimerização, permitindo que o íon cloreto atravesse a membrana. Consequentemente, seu fechamento se dá pela hidrólise do ATP, resultando na separação do dímero NBD e restaurando a conformação dos domínios TMDs^{11,24,25}.

Além da condução de íons de cloreto, nas vias aeríferas o canal CFTR também funciona como regulador de outros canais, como o canal de sódio (ENaC que desempenha papel central na absorção de sal e atua como canal de transporte de bicarbonato, que regula a homeostase do pH do líquido da superfície das vias aeríferas, o sistema de imunidade inata e a viscosidade do muco^{11,25}.

1.3 Manifestações clínicas

A proteína CFTR possui papel fundamental no equilíbrio osmótico e na viscosidade do muco presente sobre a membrana apical das células epiteliais dos pulmões, trato respiratório superior, pâncreas, fígado, vesícula biliar, intestinos, glândulas sudoríparas e sistema reprodutivo^{4,25}, tornando a FC uma doença que afeta múltiplos órgãos e sistemas²⁵.

Apesar da FC ser associada classicamente a alterações respiratórias e gastrointestinais (pâncreas, fígado e trato biliar)¹² os sintomas da doença e seu curso são variados, podendo começar desde alguns meses após o nascimento ou até anos depois, apresentando também formas leves e atípicas, sendo necessário, portanto, atenção a pacientes que exibem desde poucos sinais clínicos e a outros que apresentam sintomas típicos de FC - maior gravidade fenotípica⁴.

1.3.1 Manifestações pulmonares na FC

O aumento da viscosidade e o acúmulo de muco nas vias aeríferas leva à sua obstrução, promovendo infecções recorrentes, inflamação crônica, remodelação tecidual e o consequente declínio da função pulmonar por, principalmente, bronquiectasias^{4, 5, 26}. As principais infecções ocorrem devido a presença de bactérias patogênicas e oportunistas, dentre elas *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*²⁶.

As manifestações clínicas respiratórias se iniciam com a tosse produtiva persistente, alterações no escarro (desde consistência a volume), diminuição de apetite e perda de peso. À medida que a doença progride para uma bronquiectasia, os sinais e sintomas clínicos passam a incluir exacerbações agudas de tosse, taquipneia, dispneia, mal-estar e anorexia^{4,26}. Esses eventos agudos melhoram com o tratamento da doença respiratória, mas, frequentemente, progridem para a perda permanente da função pulmonar⁴.

Com danos progressivos, a doença pulmonar continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade na FC^{5, 12, 26}.

1.3.2 Manifestações extra-respiratórias

Presente em cerca de 20% dos pacientes, a obstrução intestinal do período neonatal é a primeira manifestação clínica da FC^{27, 28}. Junto ao teste do suor (cloreto ≥ 60 mEq/L e regiões limítrofes entre 40 e 50 mEq/L) e a insuficiência pancreática, o íleo meconial é considerado um critério de diagnóstico por sua especificidade na ligação com FC e ambas as manifestações clínicas estão relacionadas aos alelos mais graves do gene CFTR¹². Em estudos sobre suscetibilidade, variantes encontradas no gene SLC26A9 foram associadas ao maior risco para o nascimento com o íleo meconial^{12, 27}.

Pacientes com FC são caracterizados dentre “insuficientes pancreáticos” ou “suficientes pancreáticos” de acordo com a capacidade do pâncreas de secretar as enzimas digestivas na fase luminal do processo de digestão. A insuficiência pancreática ocorre em cerca de 85% dos pacientes com FC antes de completarem um ano de vida, com quadro clínico associado à perda de peso e desnutrição^{29, 30}.

Ocorrendo entre 20-40% dos pacientes²⁶, a doença hepática associada à FC, que inclui uma variedade de sinais e sintomas hepatobiliares causadas pela doença, foi em 2007 classificada pela *North American Cystic Fibrosis Foundation* em três categorias: (i) doença pré-clínica; (ii) sem cirrose e hipertensão portal; e, (iii) com cirrose e hipertensão portal, sendo esta considerada a forma clínica mais relevante pelo seu risco de mortalidade associada³¹.

O diabetes relacionado à FC é um tipo exclusivo de diabetes, sendo considerado uma complicação frequente em pacientes com a doença. Sua prevalência é aumentada de acordo com a idade, afetando aproximadamente 2% das crianças, 19% dos adolescentes e de 40% a 50% dos adultos^{32, 33}. Essa condição clínica está relacionada a um maior declínio da função respiratória e ao papel dos genes modificadores em sua alta hereditariedade²⁷.

1.4 FC: medicina personalizada e medicina de precisão versus genes modificadores

A junção da alta incidência da FC, com a penetrância de seu fenótipo e a frequência de consequências consideradas graves e potencialmente fatais logo após o nascimento, forneceu à comunidade científica um forte incentivo para entender a FC e tratá-la da melhor forma possível³⁴.

Durante anos, o tratamento da FC, se baseou na medicina personalizada, termo utilizado para o conjunto de terapêuticas desenvolvidas com foco no controle dos seus sinais e sintomas, retardando o progresso da doença numa melhora significativa da qualidade de vida do paciente, entretanto sem tratar a causa subjacente²³. A junção dos avanços clínicos e terapêuticos com os programas de triagem neonatal e gestão de saúde, aumentaram significativamente a expectativa de vida desses indivíduos para a faixa de 40 anos ou mais²⁴. Inclui-se nesta linha de tratamento o uso de antibióticos, broncodilatadores e agentes mucolíticos para as manifestações pulmonares, anticoagulantes e a suplementação enzimática para as manifestações digestivas^{12, 18, 35}. Fora os tratamentos farmacológicos, os pacientes também incorporam em seu manejo diário fisioterapias, exercícios aeróbicos, suportes fisiológicos e nutricionais^{5, 35}.

A descoberta do gene *CFTR* desempenhou um papel significativo para o diagnóstico molecular da FC¹¹, havendo um reconhecimento de fenótipos expandidos e o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas³⁶. Da mesma forma, os avanços na área molecular foram o ponto de partida na elaboração de estratégias terapêuticas direcionadas com maior eficácia nos resultados¹². Assim, em 2015, o termo Medicina de Precisão passou a ser utilizado para descrever novas terapias que unem as informações clínicas e o tratamento via medicina personalizada com o perfil genético de cada indivíduo³⁷, desenvolvendo drogas com poder de modular o defeito básico no gene *CFTR*, avançando no tratamento desse paciente^{23, 38}.

Embora seja uma doença monogênica com diversidade de variantes no gene *CFTR*, a variabilidade fenotípica apresentada na FC é modulada parcialmente pelos fatores ambientais como poluição e ingestão de altos níveis de arsênico ou fumaça de cigarro³⁹, como também por variantes presentes em modificadores genéticos. Os genes modificadores são genes com variantes não patogênicas em si, mas que podem modular a gravidade da FC, bem como a resposta aos diferentes fármacos

utilizados no manejo do paciente^{18, 27, 39}. Assim sendo, os fatores ambientais e os genes modificadores contribuem na explicação de como as mesmas variantes do gene *CFTR* se apresentam clinicamente diferentes³⁹.

1.5 Drogas moduladoras da fibrose cística

Em busca da medicina de precisão para a FC, a *Food and Drug Administration* dos EUA e a Agência Europeia de Medicamentos aprovaram em 2012 a primeira droga moduladora do gene *CFTR*, o potencializador Ivacaftor (VX-770) com o objetivo de aumentar a probabilidade de abertura do canal CFTR que contém ao menos uma alteração de *gating* ou condutância (classes III e IV, respectivamente), auxiliando na condução dos íons de cloreto e bicarbonato^{15, 35}. Esse medicamento foi inicialmente autorizado para o uso em pacientes com FC com idade superior a 6 anos que apresentavam a variante p.Gly551Asp (classe III) em pelo menos um alelo¹⁸.

Embora aproximadamente 15% dos pacientes com FC possuem essa classe de variantes, podendo apresentar uma boa resposta ao tratamento com Ivacaftor, é a deleção p.Phe508del, a variante de maior incidência dentre os pacientes com FC. Cerca de 90% dos pacientes apresentam um alelo com a deleção, enquanto ~50% são homozigotos^{18, 35}, tornando essa variante um dos principais alvos de ensaios clínicos¹⁹.

Assim, o corretor Lumacaftor (VX-809) foi desenvolvido para melhorar o processamento e tráfego do canal CFTR defeituoso do retículo endoplasmático até a superfície celular³⁵. E, posteriormente, foi combinado com o potencializador Ivacaftor (comercialmente Orkambi®) em estudos com pacientes homozigotos p.Phe508del^{18, 23}, sendo relatado uma melhora moderada, porém significativa, da função pulmonar (entre 3 e 4 pontos percentuais) e da diminuição das taxas de exacerbação pulmonar¹⁸.

Ao todo são cinco tipos de drogas moduladoras do canal CFTR agrupadas de acordo com suas funções: agentes de leitura, corretores, potencializadores, amplificadores e estabilizadores²⁴. Apesar do progresso no desenvolvimento desses moduladores, há muitas variantes patogênicas presentes no gene *CFTR* que ainda não apresentam tratamento específico. Já para o grupo de pacientes que podem fazer uso dos moduladores, sabe-se que sua resposta ao tratamento não depende

apenas de suas variantes no gene *CFTR*, mas também da variabilidade do seu genótipo para os genes modificadores. Além disso, nem todos os pacientes conseguem arcar com o alto custo dos medicamentos^{15, 17, 18, 24, 37}. Concomitantemente, na literatura, alternativas visando modular outros canais transportadores de íons (não *CFTR*) surgem com o objetivo de beneficiar todos os pacientes com FC independente da classe de suas variantes, compensando, dessa forma, a disfunção da *CFTR*^{17, 18, 24, 40}.

1.6 Genes modificadores

Apesar dos inúmeros avanços nos estudos moleculares, apenas as variantes conhecidas no gene *CFTR* não explicam a grande variação na gravidade das manifestações pulmonares e nas demais comorbidades associadas à FC, sendo, portanto, necessária a identificação de outros genes como possíveis candidatos a modificação desses fenótipos¹².

Esse fato se consolidou com a apresentação de estudos de herdabilidade entre pares de irmãos com as mesmas variantes no gene *CFTR*, que apresentaram heterogeneidade clínica em seus fenótipos^{12, 16, 41}. Assim, desde o final dos anos 90, a busca pelos genes modificadores do canal *CFTR* e do fenótipo clínico da FC tornou-se um desafio, tanto na busca do conhecimento fisiopatológico da FC quanto na tentativa de desenvolver novos alvos terapêuticos^{12, 42}.

Desta forma, nosso grupo de pesquisa vem descrevendo o papel de diversos genes relacionados às diferentes manifestações clínicas e na resposta aos moduladores da FC⁴³⁻⁵⁶.

Por ser um canal de cloreto expresso no epitélio celular dos órgãos afetados pela FC, o canal *SLC26A9* tem sido investigado por sua associação a variabilidade clínica da FC, sua interação física com o canal *CFTR* e por seu potencial papel como alvo terapêutico desta doença⁵⁷.

1.6.1 Gene *SLC26A9*

O gene Solute Carrier Family 26 Member 9, *SLC26A9* pertence à família de transportadores de ânions, sendo expresso nas células epiteliais principalmente do estômago, íleo, pâncreas, duodeno e trato respiratório^{17,24}. No epitélio celular das vias aeríferas, sua ativação ocorre facilmente quando inserido na membrana plasmática, diferindo do canal *CFTR*²⁴.

Em 2018, Balázs e Mall apresentaram um compilado de resultados que evidenciaram a condução de íons de cloreto através do epitélio celular por meio dos canais SLC26A9, considerando-o como uma via alternativa no transporte desse íon para compensar o mau funcionamento do canal CFTR em pacientes com FC.

Curiosamente, propõem-se que esses dois canais se interajam fisicamente e funcionalmente entre si em condições fisiológicas e patológicas. No entanto, a regulação e interação entre eles ainda não são totalmente compreendidos nas vias aeríferas⁵⁷.

Variantes de nucleotídeo único (SNVs) nesse gene foram relacionadas à gravidade da doença pulmonar e no desenvolvimento precoce da insuficiência pancreática exócrina, íleo meconial e na infecção pela bactéria *P. aeruginosa*. Também há relatos sobre seu papel associado à asma infantil e ao retardo na idade inicial do diabetes relacionado à FC^{24,58}. Já em relação à resposta às drogas moduladoras, variantes neste gene foram associadas à variabilidade nas manifestações pulmonares na presença do potencializador Ivacaftor⁵⁹. Já o uso da droga corretora Lumacaftor ocasionou o aumento da expressão tanto do canal CFTR quanto do canal SLC26A9, indicando que o resgate do canal CFTR pela droga também está associado ao redirecionamento do canal SLC26A9 até a membrana¹⁷.

A variante rs7512462 (Transcrito: NM_052934.4; Protein ID: NP_443166.1; Uniprot peptide: Q7LBE3-1), presente no íntron 5 do gene SLC26A9, foi associada à doença pancreática grave, valor elevado de tripsinogênio imunorreativo neonatal e presença de íleo meconial ao nascimento^{17, 55, 60}. A presença do alelo C foi relatado influenciando positivamente na melhora da função pulmonar em pacientes com ao menos uma alteração de gating¹⁷. Em pacientes homozigotos para o alelo p.Phe508del, a presença do alelo C foi relacionada ao resgate do canal no uso de Orkambi®⁵⁷.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar SNVs no gene SLC26A9 que podem estar associados a diferentes respostas à terapia com Orkambi® (VX-809 + VX-770) em pacientes com FC homozigotos para a variante patogênica p.Phe508del e que apresentaram a função CFTR avaliada in vitro em estudo anterior.

2.2 Objetivos específicos

Em pacientes com FC homozigotos para a variante patogênica p.Phe508del e que apresentaram a função CFTR avaliada in vitro em estudo anterior,

- Realizar o sequenciamento de Sanger do gene SLC26A9, identificando SNVs nas regiões codificantes e nas regiões éxon-íntron;
- Realizar o estudo in silico das variantes encontradas no gene SLC26A9;
- Verificar se existe associação entre as variantes encontradas no gene SLC26A9 e a resposta do canal CFTR à droga moduladora Orkambi® em cultura de células epiteliais nasais humanas.

MÉTODOS

3. Método

3.1 Pacientes e critérios de inclusão

O presente estudo foi composto por pacientes com FC recrutados do Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, localizada na cidade de Campinas, no estado de São Paulo, Brasil.

O recrutamento dos pacientes ocorreu para a realização de dois projetos anteriores do nosso grupo de pesquisa^{56, 61}.

Os critérios de inclusão dos pacientes neste trabalho foram:

1. A presença de resultados alterados em pelo menos dois testes de cloro no suor com valores iguais ou superiores a 60 mEq/L em cada exame, caracterizando o diagnóstico de FC.
2. A identificação da variante p.Phe508del em homozigose no gene *CFTR*;
3. Ausência do uso de drogas moduladoras até a data da análise das culturas de células nasais;
4. Função do canal CFTR investigada *in vitro* por modelo de cultura de células epiteliais nasais realizada no estudo anterior do nosso grupo por Kmit et al. (2019).

O projeto teve aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, segundo o protocolo de deliberação Nº 948.757. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque (Adotada na 18ª Assembléia Médica Mundial, Helsinki, Finlândia, 1964).

Dentre os 12 pacientes que participaram do estudo de Kmit et al. (2019), dois não tinham o estudo com a droga Orkambi®, e um não tinha mais amostra de DNA disponível para a análise de variantes no gene *SLC26A9*, totalizando nove pacientes para a realização do presente estudo.

Assim, para o presente estudo foram utilizadas apenas as amostras de DNA já armazenadas no Biorrepositório de DNA do Laboratório de Genética Molecular, sob responsabilidade da Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo. Uma nova coleta das

amostras, bem como o acompanhamento desses pacientes no Ambulatório de pediatria não foram possíveis devido ao período de maior incidência da pandemia causada pelo SARS-CoV-2 (do inglês, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2).

Como parte da rotina de diagnóstico de FC, as coletas de sangue periférico foram realizadas no Ambulatório de Pediatria e as amostras dos indivíduos foram encaminhadas ao Laboratório de Genética Humana da instituição, onde foram extraídos o material genético pelo método de fenol/clorofórmio ou cloreto de lítio, com posterior quantificação pelo aparelho Epoch (Highland Park, Winooski, EUA). O diagnóstico molecular das variantes no gene CFTR foi realizado por TaqMan SNP Genotyping Assay no 7500 Real-Time PCR Systems® (Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras foram identificadas por códigos para preservação do sigilo dos pacientes.

Todos os pacientes e seus responsáveis recebem orientações sobre a triagem laboratorial de FC e os que concordaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com os estudos anteriores, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição autorizando a coleta e armazenamento de sua amostra biológica para estudos futuros.

3.2 Triagem de variantes no gene *SLC26A9*

3.2.1 Padronização das reações em cadeia de polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) e amplificação dos fragmentos

A amplificação dos éxons codificantes (éxon 2 ao éxon 22) e os íntrons adjacentes foram feitos por meio da técnica PCR, com *primers* específicos desenhados de acordo com as especificações descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição da sequência dos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR para a identificação de variantes nos exons codificantes (exón 2 ao exón 22) e regiões intrônicas adjacentes do gene SLC26A9, e o tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação.

Éxon	Primers 5' → 3'		Tamanho do fragmento (pb)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
2	CTTGAGGTCATCTCAGCTATCC	CATCATTGAGAACCTCACTTCC	783
3 e 4	GAGCAGGATATGATAATCCCTC	TAGGACTGACCAGGAACAACCTC	587
5	GCCACTACAGGGACATTTGGAC	GCCCCCTAAATCAGATTTAGCAT C	610
6	CAGCCATGTAGAGCACAGTGAA	CCTCAGAATCCTCTCTGAACAAC	475
7 e 8	GTCTTGGTGTGCCTCCATTAG	CAGTTTCGACTGCACTTTCA	748
9	GAAGACCACATAGCACCAAAG	GGCCTAAGACCTGAGAGTGAC	692
10 e 11	CACTGGGTCACTCTCAGGTC	GCCTCACTATGGACAAGGTTAC	724
12	GAGTCTAATCCCTAGGCAACAT T	CCAGCAGATGGCTGAGTTAG	606
13	CCTTGGCTAATCCAGGAAGACT	TGGAAGGTACAGTGGACTAAGC	287
14, 15 e 16	GTGAGGACAGGACCCCATC	GTAACAGGGGGCAGTATCAG	713
17	GTCTGTGTTCAACATCACCG	GGAGAATGTCTCAACCTGGTG	588
18	GAAGTGGTGTGCTTTGCTGCTA	CTCTTTGGACTTGTACCTGAAGC	378
19	GATATTGCACTGCCAATGCC	GGAACCTAAACCTTCTCCTGTG	399
20	GACAAAGCAGGCAAAGTGAG	CTGGAGGTGAGACAGCTGAGTG	541
21 e 22	CTCTTGGTTGCAGCCACTGTG	GGTGTGGAGAGCACATGGTC	687

Para um volume de 10 µL de reação, a padronização foi realizada utilizando 50 ng de DNA genômico, 5 U/µL da enzima Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Massachusetts, EUA), tampão de PCR 10x Taq Buffer com KCL (Fermentas™, Life Sciences, Massachusetts, EUA), 50 mM de MgCl₂, 25 mM de DNTP (Ludwig Biotecnologia™, Rio Grande do Sul, Brasil), 25 mM dos *primers forward* e *reverse* (Sigma-Aldrich Darmstadt™, Missouri, EUA e Bioneer Corporation™, California, EUA), completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradiente S (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha), tendo as condições de PCR sido padronizados para todos os conjuntos de primers nas seguintes condições: (i) Desnaturação inicial do DNA à 94 °C/5 min; (ii) 20 ciclos de desnaturação a 94 °C/30 s, anelamento de 70 °C/30 s com redução de temperatura

a 0,5°C a cada ciclo até atingir 60°C, extensão de 72 °C/1 min, (iii) 20 ciclos de desnaturação à 94 °C/30 s, anelamento de 60 °C/30 s e extensão de 72 °C/1 min; (iv) 72 °C/10 min para extensão. A reação foi mantida a 10 °C após a amplificação. Com o objetivo de aumentar a especificidade das PCRs, utilizamos o PCR *touch-down*. A visualização do produto das amplificações foi realizada em gel de agarose a 1%.

3.2.2 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas com o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, EUA), sendo constituídas de 2,5 µL do produto da PCR, 4,5 µL de água; 2 µL de tampão do kit, 0,5 µL de solução de BigDye e 0,5 µL do primer forward ou reverse. As condições de amplificação foram: 96 °C/1 min; 25 ciclos de 96 °C/10 s, 60 °C/5 s e 60 °C/4 min; finalizando com 4 °C hold. Utilizando o termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradiente S (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha).

Após amplificação, foi dado um spin na placa de sequenciamento e adicionado 2,5 µL de EDTA (a 125 mM, Amresco Inc., Ohio, EUA) e 25 µL de etanol absoluto 100% (Merck®, Darmstadt, Alemanha) em cada poço, a placa foi selada e invertido 10 vezes. Após incubar por 15 minutos em temperatura ambiente, a placa foi centrifugada por trinta minutos a 4.000 r.p.m. na centrífuga 5804 R (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). Após descartar o sobrenadante e centrifugar a placa invertida em momo spin, foram adicionados 30 µL de etanol 70% (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado a 1.650 r.c.f. por 15 minutos com a centrífuga refrigerada à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e realizou-se novamente o spin. A placa foi colocada no termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradiente S (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) à 64°C por 3 minutos e meio para secagem. Por fim, houve a ressuspensão da placa com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems™, California, EUA) e a placa foi armazenada em papel alumínio na geladeira até o momento do sequenciamento.

Para a realização do sequenciamento, foi utilizado o sequenciador automático ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, California, EUA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.2.3 Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com a sequência de referência do gene SLC26A9 (ENST00000367135.8), com o auxílio dos programas Chromas v.2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Austrália) e CLC Sequence Viewer v.8.0 (Qiagen™, Hilden, Alemanha).

3.3 Classificação das variantes

3.3.1 Banco de dados

As variantes encontradas no gene SLC26A9 foram classificadas quanto à sua patogenicidade pelo consenso da “American College of Medical Genetics and Genomics”⁶², relatados com o auxílio da plataforma VarSome (<http://varsome.com>) uma ferramenta de busca e análise da variação genômica humana⁶³.

Também foram consultados outros bancos de dados: (a) ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) - banco de dados de acesso público contendo as relações entre as variantes genéticas e os fenótipos clínicos apresentados⁶⁴; (b) Ensembl (www.ensembl.org/index.html) - plataforma de análise e interpretação de dados que incluem anotações de genes, variantes, elementos reguladores e árvores filogenéticas⁶⁵.

3.3.2 Estudos *in silico*

Para melhor compreensão das alterações encontradas no gene SLC26A9, foram realizadas predições *in silico* em plataformas selecionadas de acordo com sua finalidade identificando o grau de patogenicidade ou neutralidade dessas variantes.

Assim, os seguintes preditores foram utilizados:

(a) SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>): utilizando sequências homólogas e as propriedades físicas dos aminoácidos,

esse programa prevê como a substituição de aminoácidos irá alterar a função da proteína. Essa ferramenta avalia as alterações missenses em intolerante se o escore for $\leq 0,05$ ou tolerante se $> 0,05$ ⁶⁶.

(b) PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2)

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>): é a ferramenta de análise que utiliza ao todo onze recursos de predições, oito para análise de sequência e três para análise estrutural, comparando as propriedades entre os alelos selvagens e mutantes em variantes missenses. As alterações são ditas possivelmente deletérias se o escore for $\geq 0,5$ ⁶⁷.

(c) Provean (Protein Variation Effect Analyzer): Com abordagem de pontuação por alinhamento, o Provean consegue analisar múltiplas substituições, deleções ou inserções de aminoácidos. As variantes são classificadas como deletérias se $\geq -2,5$ e neutras se $< -2,5$ ⁶⁸. Sua versão Web foi desativada.

(d) PredictSNP1 (for missense variants) e PredictSNP2 (for all variants)

(<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp1/> e <https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp2/>): Em cada classificador de consenso há a combinação de várias ferramentas de previsão e anotações de banco de dados, buscando otimizar a avaliação e melhorar o desempenho da previsão tanto para variantes missenses (PredictSNP1) quanto para todas as variantes encontradas (PredictSNP2) ^{69, 70}.

(e) MutationTaster 2021 (www.genecascade.org/MutationTaster2021/): Com o objetivo de auxiliar os pesquisadores e médicos na identificação de variantes patogênicas relacionadas a doenças monogênicas, a MutationTaster 2021 consiste em uma ferramenta de previsão binária (benigna ou deletéria), apresentando maior precisão dos seus resultados com o uso do classificador Random Forest juntamente com a integração de fontes de dados dos maiores projetos de sequenciamento humano (Projeto

1000 Genomas, ExAC, gnomAD)⁷¹.

(f) CADD (Combined Annotation-Dependent Depletion)

(<https://cadd.gs.washington.edu/snv>): Método de pontuação que classifica as variantes, sejam de nucleotídeo único ou inserções/deleções curtas. A pontuação realizada pelo CADD é baseada em propriedades funcionais e evolutivas das variantes, assim quando o escore C é > 10 , espera-se que a variante esteja entre as 10% mais deletérias do genoma humano⁷².

(g) Fathmm (Functional Analysis through Hidden Markov Models)

(<http://fathmm.biocompute.org.uk/>): é uma predição que se baseia na combinação de sequências homólogas e conservadas evolutivamente para avaliar as variantes em deletérias ($P \geq 0,5$) ou benignas ($P < 0,5$). O Inherited Disease analisa variantes *missenses*, discriminando em patogênicas ou neutras; Fathmm-MKL prevê as consequências funcionais de SNVs não codificantes e codificantes, e Fathmm-XF trabalha com precisão aprimorada na previsão das consequências funcionais de SNVs não codificantes e codificantes⁷³.

(h) Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>): incluindo algoritmos da *Universal Mutation Database* em sua combinação, essa ferramenta prevê variantes em sítios de splicing dentre o genoma humano⁷⁴.

3.4 Resposta do canal CFTR à droga Orkambi®

A coleta, cultura e função CFTR de células epiteliais nasais humanas foram realizadas conforme relatado na literatura (Kmit et al., 2019). As células epiteliais nasais humanas foram coletadas com uma escova interdental após lavagem nasal com solução salina 0,9% (p/v) e foram co-cultivadas com uma camada de alimentação de fibroblastos 3T3, usando um meio DMEM-F12 suplementado (Sigma-Aldrich DarmstadtTM, Alemanha) com inibidor de Rho Kinase dez μM , 1% de L-glutamina, 1%

de penicilina e estreptomicina, 10% de soro fetal bovino, 0,4% de anfotericina B, 0,16 µg/mL de tobramicina e 0,1 µg/mL de vancomicina (todos adquiridos da Sigma-Aldrich Darmstadt™, Alemanha). Depois de atingir 70-90% de confluência, as células epiteliais nasais humanas foram tripsinizadas, transferidas para filtros transmembrana (insertos de cultura celular Corning Costar® Snapwell – Sigma-Aldrich Darmstadt™, Alemanha) e cultivadas em uma interface ar-líquido por 15 a 30 dias, até que os valores de resistência fossem superiores a 1.000 Ω (Milicell® ERS-2) (Kmit et al., 2019). Em seguida, as culturas de células epiteliais nasais humanas polarizadas foram incubadas com o corretor CFTR, VX-809 a 3 µM (Lumacaftor, Selleckchem™, Houston, TX, EUA) ou 0,05% DMSO (Sigma-Aldrich Darmstadt™, Alemanha) como controle de veículo, por 48h.

As monocamadas de células epiteliais nasais humanas foram montadas em câmaras micro-Ussing e analisadas sob condições de circuito aberto a 37 °C. A função CFTR foi medida usando um estímulo cAMP (Forskolin 2 µM), e a corrente de curto-circuito equivalente (I_{sc-eq}) foi calculada conforme descrito anteriormente, ambos com a adição do potencializador CFTR, VX-770 a 10 µM (Ivacaftor, Selleckchem™, Houston, TX, EUA) e o inibidor do canal CFTR (CFInh172 a 30 µM, Sigma-Aldrich Darmstadt™, Alemanha)⁵⁶.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) v.27.0 (IBM SPSS Statistics for Macintosh, versão 27, SPSS, Inc., Armonk Nova Iorque, EUA). Para avaliar o $\Delta I_{sc-eq-FSK}$ na resposta ao Orkambi® para cada genótipo e alelos apresentados no gene *SLC26A9* foi utilizado o teste de Mann-Whitney e os resultados foram apresentados em figuras feitas com o programa GraphPad Prism versão 8.0.0 para Mac (<http://www.graphpad.com>, GraphPad Software, San Diego CA, EUA).

RESULTADOS

Artigo publicado

Identification of single nucleotide variants in SLC26A9 gene in patients with cystic fibrosis (p.Phe508del homozygous) and its association to Orkambi® (Lumacaftor and Ivacaftor) response in vitro

Luana Gavioli Santos, Stephanie Villa-Nova Pereira, Arthur Henrique Pezzo Kmit, Luciana Cardoso Bonadia, Carmen Sílvia Bertuzzo, José Dirceu Ribeiro, Taís Nitsch Mazzola, Fernando Augusto Lima Marson



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Identification of single nucleotide variants in *SLC26A9* gene in patients with cystic fibrosis (p.Phe508del homozygous) and its association to Orkambi® (Lumacaftor and Ivacaftor) response *in vitro*

Luana Gavioli Santos^{a,1}, Stéphanie Villa-Nova Pereira^{a,1}, Arthur Henrique Pezzo Kmit^{b,1},
Luciana Cardoso Bonadia^a, Carmen Sílvia Bertuzzo^a, José Dirceu Ribeiro^b,
Taís Nitsch Mazzola^{b,2}, Fernando Augusto Lima Marson^{a,b,c,2,*}

^a Laboratory of Medical Genetics and Genome Medicine, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas 13083-887, São Paulo, Brazil

^b Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas 13083-887, São Paulo, Brazil

^c Laboratory of Human and Medical Genetics, Laboratory of Cell and Molecular Tumor Biology and Bioactive Compounds, São Francisco University, Avenida São Francisco de Assis, 218, Jardim São José, Bragança Paulista 12916-900, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Edited by Nancy Hakooz

Keywords:

Cystic fibrosis
CFTR modulator drugs
Human nasal epithelial cell
Modifier genes
Orkambi®
SLC26A9

ABSTRACT

Background: Since patients with cystic fibrosis with different Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) genotypes present a wide response variability for modulator drugs such as Orkambi®, it is important to screen variants in candidate genes with an impact on precision and personalized medicine, such as Solute Carrier Family 26, member 9 (*SLC26A9*) gene.

Methods: Sanger sequencing for the exons and intron-exon boundary junctions of the *SLC26A9* gene was employed in nine individuals with p.Phe508del homozygous genotype for the CFTR gene who were not under CFTR modulators therapy. The sequencing variants were evaluated by *in silico* prediction tools. The CFTR

function was measured by cAMP-stimulated current (ΔI_{sc} -eq-FSK) in polarized CFTR of human nasal epithelial cells cultured in micro-Ussing chambers with Orkambi®.

Abbreviations: ATP, Adenosine Triphosphate; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; ABI, Applied Biosystems; CA, California; ClinVar, Clinical Variance Database; CADD, Combined Annotation Dependent Depletion; cAMP, Cyclic Adenosine Monophosphate; CF, Cystic Fibrosis; CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; CF-RD, Cystic Fibrosis-Related Diabetes; °C, Degree Celsius; dNTP, Deoxynucleoside Triphosphate; DNA, Deoxyribonucleic Acid; DMSO, Dimethyl Sulfoxide; DMEM-F12, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12; ERS, Electrical Resistance System; Isc-eq, Equivalent Short Circuit Current; ESE, Exonic Splicing Enhancers; ESS, Exonic Splicing Silencers; Fathmm-XF, Fathmm with eXtended Features; F, Female; FSK, Forskolin; h, Hour; HNE, Human Nasal Epithelial; IBM, International Business Machines Corporation; MgCl₂, Magnesium Chloride; M, Male; μ A, Microampere; μ L, Microliter; μ M, Micromolar; mEq/L, Milliequivalents per Liter; mL, Milliliter; mM, Millimolar; MAF, Minor Allele Frequency; Min, Minute; MKL, Multiple-Kernel Learning; ng, Nanograms; NY, New York; NA, No Amplification or Not Applicable; NR, Not Reported; OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man; PCR, Polymerase Chain Reaction; KCl, Potassium Chloride; S, Second; SNP, Single Nucleotide Polymorphism; dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism Database; SNV, Single Nucleotide Variant; *SLC26A9*, Solute Carrier Family 26, member 9; SIFT, Sorting Intolerant From Tolerant; cm², Square Centimeter; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences; TX, Texas; 3' UTR, Three Prime Untranslated Region; TM, Trademark; U, Unit for Enzyme; USA, United States of America; Unicamp, University of Campinas; VUS, Variant of Uncertain Significance; v/v, Volume per Volume; w/v, Weight per Volume; Y, Years.

* Corresponding author at: Laboratory of Medical Genetics and Genome Medicine, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas 13083-887, São Paulo, Brazil; Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas 13083-887, São Paulo, Brazil; Laboratory of Human and Medical Genetics, Laboratory of Cell and Molecular Tumor Biology and Bioactive Compounds, São Francisco University, Avenida São Francisco de Assis, 218, Jardim São José, Bragança Paulista 12916-900, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: luanagaviolidossantos@yahoo.com.br, 1139861@dac.unicamp.br (L.G. Santos), stephanie.vnp@gmail.com (S.V.-N. Pereira), arthurkmit@gmail.com (A.H.P. Kmit), luciana.bonadia@gmail.com (L.C. Bonadia), bertuzzo@unicamp.br (C.S. Bertuzzo), jdirceur@unicamp.br (J.D. Ribeiro), mazzolat@unicamp.br (T.N. Mazzola), fernandolimamarson@hotmail.com, fernando.marson@usf.edu.br (F.A.L. Marson).

¹ These authors contributed equally to the study as first authors.

² These authors contributed equally to the study as supervisors.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147428>

Received 4 February 2023; Received in revised form 28 March 2023; Accepted 10 April 2023

Available online 15 April 2023

0378-1119/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Results: We found 24 intronic variants, three in the coding region (missense variants - rs74146719 and rs16856462 and synonymous - rs33943971), and three in the three prime untranslated region (3' UTR) region in the *SLC26A9* gene. Twenty variants were considered benign according to American College of Medical Genetics and Genomics guidelines, and ten were classified as uncertain significance. Although some variants had deleterious predictions or possible alterations in splicing, the majority of predictions were benign or neutral. When we analyzed the Δ Isc-eq-FSK response to Orkambi®, there were no significant differences within the genotypes and alleles for all 30 variants in the *SLC26A9* gene.

Conclusions: Among the nine individuals with p.Phe508del homozygous genotype for the *CFTR* gene, no pathogenic *SLC26A9* variants were found, and we did not detect associations from the 30 *SLC26A9* variants and the response to the Orkambi® *in vitro*.

1. Introduction

Since 1989, when the discovery of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene promoted the elucidation of the molecular and cellular basis of cystic fibrosis (CF; OMIM®: no 219700), the research and the development of new technologies for early diagnosis and precise treatment are still considered critical for CF care (Marson et al., 2017; Butnariu et al., 2021). In 2012, with Food and Drug Administration and European Medicines Agency approval, the *CFTR* potentiator Ivacaftor (VX-770, Vertex Pharmaceuticals™) has been used as a *CFTR* channel improvement by amplifying the *CFTR* ATP-dependent channel opening in the apical cell, enabling the correction of the anion channel activity from patients with genetic variants as p.Gly551Asp exchange (Feng et al., 2018; Gentzsch and Mall, 2018; Pinto et al., 2021a). Although 15 % of the patients with CF could respond well to Ivacaftor monotherapy, approximately 90 % of these patients have at least one p.Phe508del exchange, which impairs *CFTR* folding, retaining the protein in the endoplasmic reticulum and promotes its degradation in the proteasome (Gentzsch and Mall, 2018). Correctors such as the Lumacaftor (VX-809, Vertex Pharmaceuticals™) restore p.Phe508del-*CFTR* folding, increasing *CFTR* function discreetly (Gentzsch and Mall, 2018; Pinto et al., 2021a). Therefore, trials with drug combinations as Ivacaftor and Lumacaftor, known as Orkambi® (VX-770 + VX-809, Vertex Pharmaceuticals™), aimed to rescue *CFTR* function from patients with p.Phe508del/p.Phe508del genotype, with still small improvements in the lung function (Skov et al., 2019; Mesinèle et al., 2022).

Besides potentiators and correctors, read-through agents, amplifier and stabilizer compounds, and a combination of these modulator drugs are currently used for the CF therapy (Marson et al., 2017; Pinto et al., 2021a; Haq et al., 2022). However, the interaction of *CFTR* variants with their modulation genes, environment, and lifestyle impacts the therapy response (Marson et al., 2017; Gentzsch and Mall, 2018). Hence, the modulation of other channels/transporters is expected to be an alternative to improve clinical outcomes regardless of the *CFTR* variants of the patients with CF (Pinto et al., 2021a). Balázs and Mall (2018) revised the role of the Solute Carrier Family 26, member 9 (*SLC26A9*) protein as an epithelial chloride channel in the respiratory system, ileus, and pancreas, among other organs affected by CF (Balázs and Mall, 2018). Although it is known that there is a physical interaction between *SLC26A9* and *CFTR* channels, both in physiology and pathology, and colocalization in cells, which could reveal *SLC26A9* as a potential therapeutic target to bypass the *CFTR* ion transport deficiency (Bertrand et al., 2009; Balázs and Mall, 2018; Sato et al., 2019; Quesada and Dutzler, 2020; Pinto et al., 2021b), its traffic regulation signals and its interaction with *CFTR* are not yet fully understood in the airways (Liu et al., 2015; Quesada and Dutzler, 2020; Gorrieri et al., 2022).

Currently, rs7512462 single nucleotide variant (SNV) in the *SLC26A9* gene (Transcript: NM_052934.4; Protein ID: NP_443166.1; Uniprot peptide: Q7LBE3-1) was associated with pancreatic damage and higher neonatal immunoreactive trypsinogen, CF-related diabetes, meconium ileus, and lower or lack of response to *CFTR* modulation drugs (Balázs and Mall, 2018; Miller et al., 2015; Pereira et al., 2017). Besides that, this variant does not alter the *SLC26A9* protein. In such

context, we aimed to investigate SNVs in the *SLC26A9* gene that, together with rs7512462, could be associated with differences in response to Orkambi® (VX-809 + VX-770) therapy in patients with CF who were homozygous for p.Phe508del pathogenic variant and that presented the *CFTR* function evaluated *in vitro*.

2. Methods

2.1. Patients

The individuals were recruited in the Pediatrics Outpatient Unit for CF at the Clinical Hospital at the University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil. CF diagnosis was routinely made with two sweat tests with chloride ion ≤ 60 mEq/L, along with the molecular diagnosis of the *CFTR* variants by TaqMan SNP Genotyping Assay in a 7500 Real-Time PCR Systems® (Waltham, Massachusetts, EUA). Nine patients with p.Phe508del/p.Phe508del genotype and who were not using the *CFTR* modulators (VX-809 and VX-770), which took place by Kmit et al. (2019), were enrolled in the present study. The participants or their legal guardians signed the Informed Consent Form under the approval of the Ethics Committee from the Unicamp (no 948.757/2015 and no 91.041.317/2019). The procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration.

2.2. *SLC26A9* genetic variants screening

DNA extraction from peripheral blood samples was performed by phenol/chloroform or lithium chloride methods. After DNA quantification in Epoch (Highland Park, Winooski, USA), DNA concentration was adjusted to 50 ng/μL. Twenty-one exons (two to 22) from the *SLC26A9* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with ultrapure water, 10x Taq Buffer with KCl (Fermentas™, Life Sciences, Massachusetts, USA), 25 mM dNTP (Ludwig Biotechnologia™, Rio Grande do Sul, Brazil), 25 mM forward and reverse primers (Sigma-Aldrich Darmstadt™, Missouri, USA or Bioneer Corporation™, California, USA), 50 mM MgCl₂, 5 U/μL Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Massachusetts, USA) and 50 ng/μL DNA. The PCR conditions were (i) denaturation at 94 °C/5 min; (ii) 20 cycles of denaturation at 94 °C/30 s, annealing at 70 °C/30 s with a temperature reduction of 0.5 °C every cycle until the temperature reached 60 °C, extension at 72 °C/1 min; (iii) 20 cycles of denaturation at 94 °C/30 s, annealing at 60 °C/30 s, extension at 72 °C/1 min; and (iv) extension at 72 °C/10 min. After the amplification, the reaction was then held at 10 °C. We used the touch-down PCR to decrease off-target priming and to increase the specificity of PCRs. Supplementary Table 1 shows the primers used to amplify the *SLC26A9* fragments.

Sanger sequencing of the *SLC26A9* gene was performed with Big-Dye™ according to the manufacturer's protocol (ThermoFisher Scientific™, Massachusetts, USA) in the ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, California, USA). Chromas v.2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia) and CLC Sequence Viewer v.8.0 (Qiagen™, Hilden, German) softwares were used to compare the obtained sequences to the *SLC26A9* gene reference sequence

(ENST00000367135.8).

2.3. *In silico* predictions to evaluate missense, synonymous, intronic, and splice site variants of SLC26A9 gene

The SLC26A9 variants were evaluated with the following *in silico* computational prediction tools:

SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant): uses homology among protein sequences to evaluate the missense alterations into deleterious if the score is ≤ 0.05 or tolerated if > 0.05 (Ng and Henikoff, 2001).

PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2): uses protein structure to evaluate the missense alterations as possibly deleterious if the score ≥ 0.5 (Adzhubei et al., 2010).

Provean (Protein Variation Effect Analyzer): evaluates how missense and indel alterations could impact the protein function. It is considered deleterious if ≥ -2.5 and neutral if < -2.5 (Choi and Chan, 2015).

PredictSNP1 (for missense variants) and PredictSNP2 (for all variants): combine various *in silico* prediction tools and database annotations to evaluate variants as neutral or deleterious (Bendl et al., 2014; Bendl et al., 2016).

Mutation Taster 2021: combine various *in silico* prediction tools, database annotations, and Random Forest methods to evaluate variants as benign or deleterious (Steinhaus et al., 2021).

CADD (Combined Annotation Dependent Depletion): evaluates natural selection as a factor that could impact missense and indel alterations. When the C score is > 10 , the variant is predicted to be among the 10 % more deleterious from the human genome (Rentzsch et al., 2021).

Fathmm: uses homology and conservation among genetic sequences to evaluate the variant into deleterious ($P \geq 0.5$) or benign ($P < 0.5$). Inherited Disease analyses protein missense variants, Fathmm-MKL predicts the functional consequences of non-coding and coding SNVs, and Fathmm-XF works with improved accuracy in predicting the functional consequences of non-coding and coding SNVs (Shihab et al., 2014).

Human Splicing Finder: combines algorithms to predict variants in splicing sites in the human genome (Desmet et al., 2009).

In addition, we consulted the Ensembl, ClinVar, and VarsSome databases to describe the frequency of the SLC26A9 variants in the global population (Richards et al., 2015; Landrum et al., 2020; Cunningham et al., 2022).

2.4. CFTR response for the Orkambi®

Human nasal epithelial (HNE) cell collection, culture, and CFTR function were performed as reported in the literature (Kmit et al., 2019). HNE cells were collected with an interdental brush after nasal washing with 0.9 % (w/v) saline solution and were co-cultured with a feed layer of 3T3 fibroblasts, using a supplemented DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) medium (Sigma-Aldrich Darmstadt™, Germany) with 10 μ M Rho Kinase inhibitor, 1 % L-glutamine, 1 % penicillin and streptomycin, 10 % newborn calf serum, 0.4 % amphotericin B, 0.16 μ g/mL tobramycin and 0.1 μ g/mL vancomycin (all purchased from Sigma-Aldrich Darmstadt™). After reaching 70–90 % confluence, HNE cells were trypsinized, transferred to transmembrane filters (Corning Costar® Snapwell cell culture inserts – Sigma-Aldrich Darmstadt™), and cultured in an air-liquid interface for ~15–30 days, until the transepithelial resistances values were higher than 1,000 Ω (Millicell® ERS-2) (Kmit et al., 2019). Then polarized HNE cells cultures were incubated with the CFTR corrector 3 μ M VX-809 (Selleckchem™, Houston, TX, USA), or 0.05 % (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich Darmstadt™) as vehicle control, for 48 h.

HNE cell monolayers were mounted on micro-Ussing chambers and analyzed under open-circuit conditions at 37 °C. The CFTR function was measured using a cAMP stimulus (Forskolin 2 μ M), and the equivalent

short circuit current (Isc-eq) was calculated as previously described both with the addition of the CFTR potentiator 10 μ M VX-770 (Selleckchem™, Houston, TX, USA) and the CFTR channel inhibitor (30 μ M CFTInh172, Sigma-Aldrich Darmstadt™) (Kmit et al., 2019), in triplicates.

2.5. Statistical analysis

Bivariate statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 27.0, IBM Inc, Armonk NY, USA). We used the Mann-Whitney test in the bivariate statistical analysis to evaluate the Δ Isc-eq-FSK for the response to the Orkambi® according to the SNV (genotype and alleles) in the SLC26A9 gene, and the results are shown in figures made with GraphPad Prism version 8.0.0 for Mac (<https://www.graphpad.com>, GraphPad Software, San Diego CA, USA).

3. Results

Table 1 shows the demographic and clinical aspects of the patients with CF (p.Phe508del homozygous) at the time of the CFTR activity assay analysis. Most patients were male (6/9) and had pancreatic insufficiency (8/9). Only 3/9 had meconium ileus, and 1/9 had CF-related diabetes diagnoses. Table 1 also shows the genotype for the variants found in the SLC26A9 gene, including rs7512462. We found 24 variants in intronic regions, three in the exonic regions [two missenses (rs74146719 and rs16856462) and one synonymous (rs33943971)], and three in the three prime untranslated region (3' UTR) (rs9438399, rs6669481, and rs9438438). Their genomic coordinates, frequencies, and classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines are shown in Table 2 and Supplementary Table 2. The results for *in silico* computational predictors analyses are presented in Table 3 for SLC26A9 variants in exonic and 3' UTR regions and genetic variants in the intronic regions with a predictor score that can affect the SLC26A9 expression. The complete information for the *in silico* computational predictors analyses is presented in Supplementary Table 3. In addition, CFTR function in HNE cells with VX-770 and VX-809 drugs is presented in Table 1.

The rs74146719 variant in exon 17 promotes a p.Pro606Leu change, not reported in ClinVar but considered benign according to the ACMG and all *in silico* predictions, except for Fathmm-Inherited disease and Fathmm-MKL (damaging/deleterious). Similarly, the variant rs16856462 in exon 19, which promotes a p.His748Arg change, was reported/considered as benign in ClinVar, the ACMG Guidelines, and most of the *in silico* predictions, except for Fathmm-Inherited disease (damaging) and Human Splicing Finder (which detected an alteration of auxiliary sequences and significant alteration of the ESE/ESS motifs ratio). The synonymous variant rs33943971 in exon 5 was not reported in ClinVar but was considered benign according to most of the *in silico* computational predictions and the ACMG guidelines. Yet, the Human Splicing Finder predicted an alteration of auxiliary sequences and a significant alteration of the ESE/ESS motifs ratio, which could interfere with the splicing process (Table 3).

Although the variants rs9438399, rs6669481, and rs9438438 are in the 3' UTR region of SLC26A9 for isoform A of the SLC26A9 channel, they are within the transcript region for isoform B, which is generated by alternate splicing, coding for c.*297C > A (p.Thr832 =), c.*211A > G (p.Arg804Gly), and c.*423A > G (p.Pro874 =) nucleotide changes, respectively (Table 3). Both variants rs6669481 and rs9438438 were reported in ClinVar as benign, and all three were considered benign according to all the *in silico* computational predictions and the ACMG guidelines (Table 3).

The intronic variants were not reported in ClinVar, except for rs12759719 (reported as benign). PredictSNP2 and CADD reported most variants as neutral or benign, except for intronic variants rs185066190 and rs11240593, which were considered deleterious. The rs11240593

Table 1

Clinical data, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) function in human nasal epithelial (HNE) cells with VX-770 and VX-809 drugs, and genotype for variants screened in the *Solute Carrier Family 26, member 9* (SLC26A9) gene from patients with cystic fibrosis (p.Phe508del homozygous).

Patient	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
Sex	F	F	M	M	M	M	M	M	F	
Age (y)	8	8	16	6	13	20	42	11	9	
Pancreatic insufficiency	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
Meconium ileus	No	No	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes	
CF-RD	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	
Δ Isc-eq-FSK (μ A/cm ²)										
DMSO	0.059 $\pm$ 0.111	0.211 $\pm$ 0.054	0.150 $\pm$ 0.036	0.187 $\pm$ 0.127	0.125 $\pm$ 0.012	0.080 $\pm$ 0.078	0.274 $\pm$ 0.087	0.185 $\pm$ 0.033	0.215 $\pm$ 0.056	
VX-809 + VX-770 (Orkambi®)	0.211 $\pm$ 0.049	0.382 $\pm$ 0.082	0.365 $\pm$ 0.163	0.381 $\pm$ 0.090	0.129 $\pm$ 0.032	0.610 $\pm$ 0.092	0.829 $\pm$ 0.244	0.487 $\pm$ 0.041	0.564 $\pm$ 0.011	
SLC26A9 genotypes										Common allele
Exonic variants										
rs33943971	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CT	CC	C
rs74146719	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	C
rs16856462	AA	AA	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AA	A
3' UTR region										
rs9438399	CC	NA	CC	CC	CA	CC	CC	CC	NA	C
rs6669481	AA	NA	AA	AA	AG	AA	AG	AG	NA	A
rs9438438	AA	NA	AA	AG	AA	AA	AG	AA	NA	A
Intronic variants										
rs7512462	TT	TT	TT	TT	TT	CT	CT	CT	CC	C
rs185066190	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	C
rs11240593	CC	CC	CC	CG	CC	CC	CC	CC	CC	C
rs12036341	TT	TT	TT	TG	TT	TT	TT	TT	TT	T
rs12143020	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	G
rs16856489	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AT	A
rs3811426	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	G
rs3811427	AA	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	A
rs146595142	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TA	TT	TT	T
rs41264907	GA	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	G
rs11240591	GG	GG	GG	AA	GG	GG	GG	GG	GG	G
rs74739480	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	G
rs3811423	CC	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CA	CC	C
rs28661171	AC	AA	AA	AA	AC	AA	AA	AA	AA	A
rs11240594	AA	AA	AA	AT	AA	AA	AA	AA	AA	A
rs3811424	TC	CC	CC	TC	TT	CC	CC	TC	TC	T
rs7366204	GG	AA	AA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	G
rs73082393	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AC	A
rs9438404	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GA	GG	GG	G
rs12083912	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	C
rs12759719	AG	GG	GG	AG	AG	GG	GG	GG	AG	A
rs12082235	CA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	C
rs17348561	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	G
rs74146718	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GG	G
rs6421774	GT	TT	TT	TT	GT	TT	TT	TT	GT	G

Δ Isc-eq: Equivalent Short-Circuit Current; 3'UTR: 3' Untranslated Region; y: Years; F: Female; FSK: Forskolin; M: Male; CF-RD: Cystic Fibrosis-Related Diabetes; NA: No Amplification; DMSO: Dimethyl Sulfoxide.

Table 2

Genomic and protein coordinates, frequencies, and classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelin es of the variants found in the *Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)* gene.

dbSNP	Nucleotide	Protein position	GnomAD Browser (MAF) v2.1.1 - Global population ^a	ClinVar	ACMG guidelines ^b Varsome (hg38)	Putative effect
Exonic variants						
rs33943971	c.540C > T	p.Thr180=	0.07 (19,560/279,762) - 930 homozygotes	NR	BA1; BP4; BP7	Benign
rs74146719	c.1817C > T	p.Pro606Leu	<0.01 (2,266/269,650) - 48 homozygotes	NR	BA1; BP1; BP4; BP6	Benign
rs16856462	c.2243A > G	p.His748Arg	0.07 (20,974/282,782) - 1,055 homozygotes	NR	BA1; BP6; BP1; BP4	Benign
3' UTR region						
rs9438399	c.*297C > A	p.Thr832=	0.02 (6,684/282,802) - 655 homozygotes	NR	BA1; BP4; BP7	Benign
rs6669481	c.*211A > G	p.Arg804Gly	0.11 (30,518/281,644) - 3,150 homozygotes	Benign	BA1; BP1; BP3; BP4; BP6	Benign
rs9438438	c.*423A > G	p.Pro874=	0.08 (21,668/282,566) - 1,043 homozygotes	Benign	BA1; BP4; BP6; BP7	Benign
Intronic variants						
rs185066190	c.1294-174 T > C	NA	<0.01 (65/31,380) - 0 homozygotes	NR	BS1	Likely benign
rs11240593	c.2111-30C > G	NA	0.16 (44,046/282,378) - 5,683 homozygotes	NR	BA1	Benign
rs12036341	c.954-241 T > G	NA	0.14 (4,396/31,342) - 501 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs12143020	c.954-231G > A	NA	0.05 (1,598/31,358) - 35 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs16856489	c.1294-232A > T	NA	0.07 (2,336/31,382) - 112 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs3811426	c.1659 + 48G > A	NA	0.15 (41,304/282,086) - 5,452 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs3811427	c.1659 + 52A > G	NA	0.10 (3,285/31,334) - 338 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs146595142	c.2257-202 T > A	NA	<0.01 (255/31,400) - 3 homozygotes	NR	BS1; BS2; BP4	Benign
rs41264907	c.2257-165G > A	NA	0.03 (1,058/31,408) - 13 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs11240591	c.2328 + 30G > A	NA	0.16 (43,850/282,128) - 5,651 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs74739480	c.-18-310G > A	NA	0.07 (2,303/31,334) - 122 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs3811423	c.376 + 42C > A	NA	0.34 (71,028/207,180) - 14,597 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs28661171	c.376 + 44A > C	NA	<0.01 (1,279/207,566) - 32 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs11240594	c.1293 + 104C > T	NA	0.19 (6,125/31,352) - 729 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs3811424	c.1101 + 82 T > C	NA	0.61 (18,991/31,302) - 6,029 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs7366204	c.1216-59G > A	NA	0.88 (27,636/31,346) - 12,203 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs73082393	c.1293 + 46A > C	NA	0.05 (15,827/282,344) - 654 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs9438404	c.1294-168G > A	NA	0.05 (1,500/31,378) - 60 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs12083912	c.1567-25C > T	NA	<0.01 (1,587/282,792) - 46 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs12759719	c.2055 + 15A > G	NA	0.91 (242,820/265,564) - 111,064 homozygotes	Benign	BP4	VUS
rs12082235	c.1774-13C > A	NA	<0.01 (1,229/257,480) - 28 homozygotes	NR	BP4	VUS
rs17348561	c.2110 + 96G > A	NA	0.04 (1,324/31,360) - 45 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign
rs74146718	c.2056-133G > A	NA	0.02 (486/31,386) - 12 homozygotes	NR	BS1; BP4	Likely benign
rs6421774	c.2257-331G > T	NA	0.77 (24,220/31,342) - 9,423 homozygotes	NR	BA1; BP4	Benign

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database; MAF: Minor Allele Frequency; ClinVar: Clinical Variance Database; NR: Not Reported ; VUS: Variant of Uncertain Significance; 3' UTR: 3' Untranslated Region; NA: Not Applicable. BA1: Allele frequency is > 5 % in Exome Sequencing Project, 1,000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium (Benign, Stand Alone); BP3: In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function (Benign, Supporting); BP4: Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, and others) (Benign, Support ing); BP6: Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation (Benign, Supporting); BP7: A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved (Benign, Supporting); BS1: Allele frequency is greater than expected for disorder (Benign, Strong); BS2: Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age (Benign, Strong).

^a <https://gnomad.broadinstitute.org/>.

^b https://www.acmg.net/docs/standards_guidelines_for_the_interpretation_of_sequence_variants.p.

was also regarded as deleterious in Fathmm-MKL prediction, while the other variants were considered benign (Table 3).

All intronic variants were considered benign in Mutation Taster and Fathmm-XF predictions. Although Human Splicing Finder classified most of the variants with no significant impact on splicing signals, there were variants reported as new acceptor splice sites with potential alteration of splicing (rs16856489, rs11240591, rs3811427, rs3811426, and rs12036341) and variants reported as alterations of auxiliary sequences with significant alteration of ESE/ESS motifs ratio (rs185066190 and rs146595142) (Table 3). The rs12143020 was regarded as new acceptor splice sites with potential splicing alteration and as alterations of auxiliary sequences with significant alteration of ESE/ESS motifs ratio (Table 3).

According to ACMG guidelines (Richards et al., 2015), most intronic variants were classified as benign or likely benign, while the rs3811423, rs3811424, rs7366204, rs3811426, rs3811427, rs12759719, rs12082235, rs73082393, rs41264907, and rs11240591 variants were considered of uncertain significance (Table 3).

We compared the Δ ISc-eq-FSK response to the Orkambi[®] within the genotypes for all variants in the *SLC26A9* gene, and we did not find significant differences regarding the rs7512462 genotype (Fig. 1A),

exonic variants (Fig. 1B), and 3' UTR variants (Fig. 1C). We also tested the Δ ISc-eq-FSK response to the Orkambi[®] within the alleles for all variants in the *SLC26A9* gene, and the absence of a significant response according to the alleles distributions as also observed for rs7512462 (Fig. 2A), exonic variants (Fig. 2B), and 3' UTR variants (Fig. 2C). Neither the intronic variants were associated with a different response to the Δ ISc-eq-FSK response to the Orkambi[®] within the genotypes (Supplementary Fig. 1) and alleles (Supplementary Fig. 2) for variants in the *SLC26A9* gene.

4. Discussion

CF disease and *CFTR* gene have been a study model of pathology, genetics, biochemistry, and therapeutics for >30 years (Lopes-Pacheco, 2020; Amaral and Harrison, 2022; de Azevedo et al., 2023). Due to the variability of CF clinical outcomes, the genetic variants in the *CFTR* gene and other genes impacting the phenotype and the drug response have been extensively studied in the search for better therapeutic responses at an individual level (Marson et al., 2017; Gentzsch and Mall, 2018; Sepahzad et al., 2021). Moreover, compensating *CFTR* dysfunction by targeting alternative ion channels has shed light on new therapeutic

Table 3

In silico computational predictor analyses of the exonic, 3' UTR, and intronic variants found in the *Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)* gene.*.

dbSNP	SIFT non-synonymous SNV ^a	PolyPhen2 (Hum Div) ^b	Provean ^c	PredictSNP		Mutation taster 2021 ^f	CADD ^g	Fathmm			Human splicing finder ^k
				SNP1 ^d	SNP2 ^e			Inherited disease ^h	Fathmm-MKL ⁱ	Fathmm-XF ^j	
Exonic variants											
rs33943971	-	-	-	-	Neutral (-0.63)	Benign	Benign (5.57)	-	Benign (0.02)	Benign (0.01)	Alteration of auxiliary sequences. Significant alteration of ESE/ESS motifs ratio.
rs74146719	Tolerated (0.32)	Benign (0.01)	Neutral (0.35)	Neutral (0.83)	Neutral (-1)	Benign	Deleterious (12.16)	Damaging (-2.96)	Deleterious (0.86)	Benign (0.30)	No significant impact on splicing signals.
rs16856462	Tolerated (0.61)	Benign (<0.01)	Neutral (0.08)	Neutral (0.83)	Neutral (-1)	Benign	Benign (0.001)	Damaging (-2.92)	Benign (0.01)	Benign (0.03)	Alteration of auxiliary sequences. Significant alteration of ESE/ESS motifs ratio.
3' UTR											
rs9438399	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (0.13)	-	Benign (<0.01)	Benign (0.01)	NR
rs6669481	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (0.47)	-	Benign (0.14)	Benign (0.10)	NR
rs9438438	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (0.51)	-	Benign (<0.01)	Benign (0.01)	NR
Intronic variants											
rs185066190	-	-	-	-	Deleterious (1)	Benign	Deleterious (10.56)	-	Benign (0.30)	Benign (0.04)	Alteration of auxiliary sequences. Significant alteration of ESE/ESS motifs ratio.
rs11240593	-	-	-	-	Deleterious (1)	Benign	Deleterious (12.44)	-	Deleterious (0.54)	Benign (0.18)	No significant impact on splicing signals.
rs12036341	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (3.67)	-	Benign (0.15)	Benign (0.04)	New acceptor splice site. Activation of a cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.
rs12143020	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (3.82)	-	Benign (0.14)	Benign (0.03)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE/ESS motifs ratio. New acceptor splice site: Activation of a cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation).
rs16856489	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (2.43)	-	Benign (0.14)	Benign (0.02)	New acceptor splice site: Activation of a cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation).
rs3811426	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (2.44)	-	Benign (0.10)	Benign (0.03)	New acceptor splice site. Activation of a cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.
rs3811427	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (6.49)	-	Benign (0.09)	Benign (0.02)	New acceptor splice site. Activation of a cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.
rs146595142	-	-	-	-	Neutral (-1)	Benign	Benign (0.47)	-	Benign (0.12)	Benign (0.02)	Alteration of auxiliary sequences. Significant alteration of ESE/ESS motifs ratio.
rs11240591	-	-	-	-	Neutral (-0.43)	Benign	Benign (4.50)	-	Benign (0.19)	Benign (0.03)	New acceptor splice site. Activation of a cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.

*We presented the information for the intronic variants with a predictor score that can affect the SLC26A9 expression. 3' UTR: 3' Untranslated Region; dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database; SNV: Single Nucleotide Variant; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; SIFT: Sorting Intolerant from Tolerant; CADD: Combined Annotation Dependent Depletion; Fathmm-XF: Fathmm with eXtended Features; Fathmm-MKL: Fathmm Multiple-Kernel Learning; NR: Not Reported; ESE: Exonic Splicing Enhancers; ESS: Exonic Splicing Silencers; -the prediction is not applied for the genetic variant.

^a https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/Extended_SIFT_chr_coords_submit.html (Ng and Henikoff, 2001).

^b <https://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (Adzhubei et al., 2010).

^c <https://provean.jcvi.org/index.php> (Choi and Chan, 2015).

^d <https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp1/> (Bendl et al., 2014).

^e <https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp2/> (Bendl et al., 2016).

^f <https://www.genecascade.org/MutationTaster2021/#transcript> (Steinhaus et al., 2021).

^g <https://cadd.gs.washington.edu/snv> (Rentzsch et al., 2021).

^h <https://fathmm.biocompute.org.uk/inherited.html> (Shihab et al., 2014).

ⁱ <https://fathmm.biocompute.org.uk/fathmmMKL.htm> (Shihab et al., 2014).

^j <https://fathmm.biocompute.org.uk/fathmm-xf/> (Shihab et al., 2014).

^k <https://umd.be/Redirect.html> (Desmet et al., 2009).

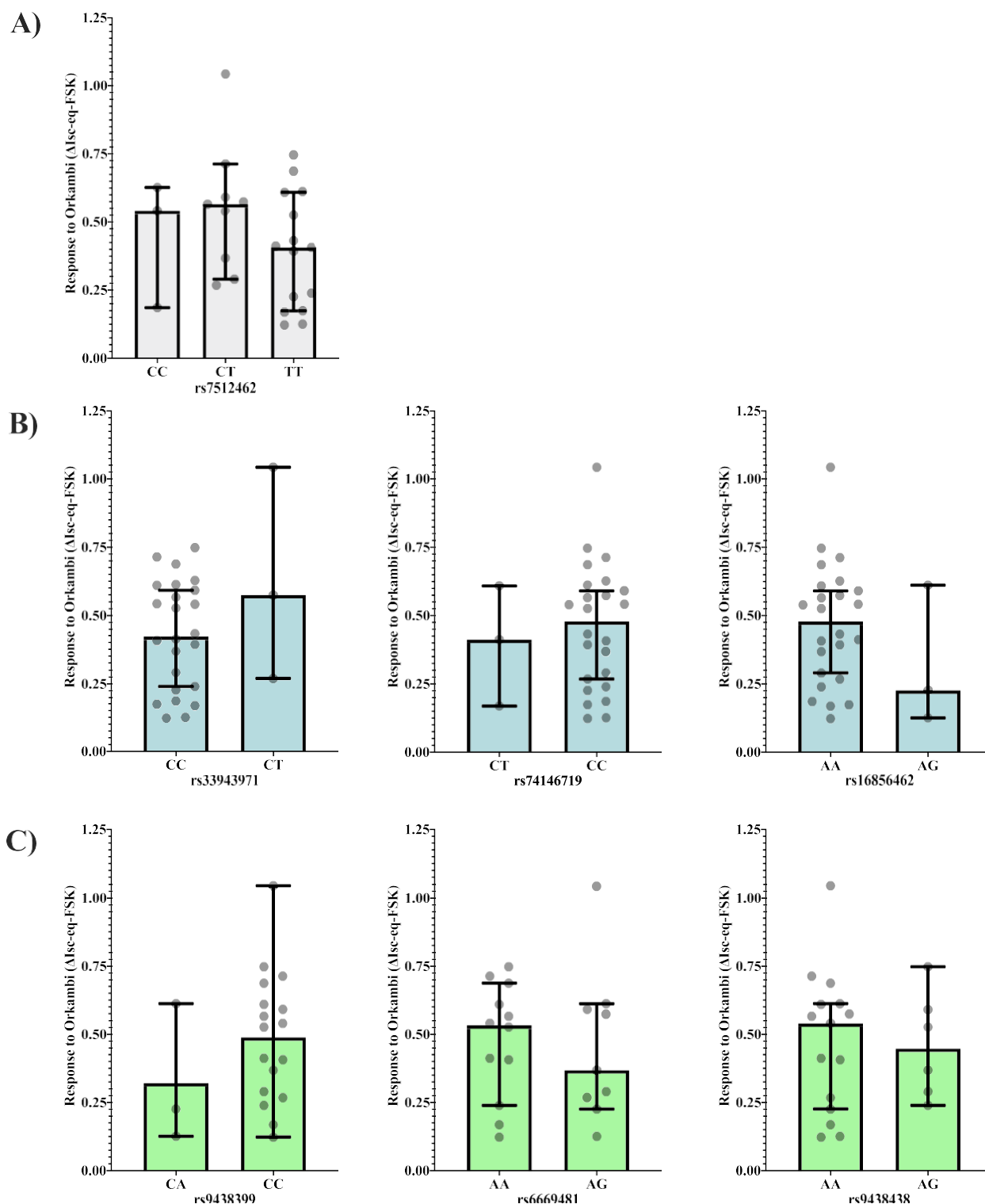


Fig. 1. Association between the genotypes of the single nucleotide variants in the *Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)* gene with Δ Isc-eq-FSK (μ A/cm²) for the response to the Orkambi® (VX-809 + VX-770). (A) We presented the information for the rs7512462 genotype. (B) We presented the information for the genotypes of the exonic variants in the *SLC26A9* gene. (C) We presented the information for the genotypes of the 3' untranslated region (UTR) variants in the *SLC26A9* gene. We did not observe any significant difference ($P > 0.05$) in response to the Orkambi® regarding the screened variants in the *SLC26A9* gene. Δ Isc-eq-FSK: equivalent short-circuit current-forskolin.

strategies with modulator drugs (Lopes-Pacheco, 2020). In this context, the interaction between *SLC26A9* and CFTR channels explains the importance of *SLC26A9* as a potential therapeutic target in CF (Bertrand et al., 2009; Balázs and Mall, 2018; Sato et al., 2019; Quesada and

Dutzler, 2020; Pinto et al., 2021b). Therefore, this study aimed to evaluate SNVs in the *SLC26A9* gene in a group of nine patients with CF harboring p.Phe508del homozygous genotype, which is the most prevalent pathogenic variant and has been associated with a worse disease

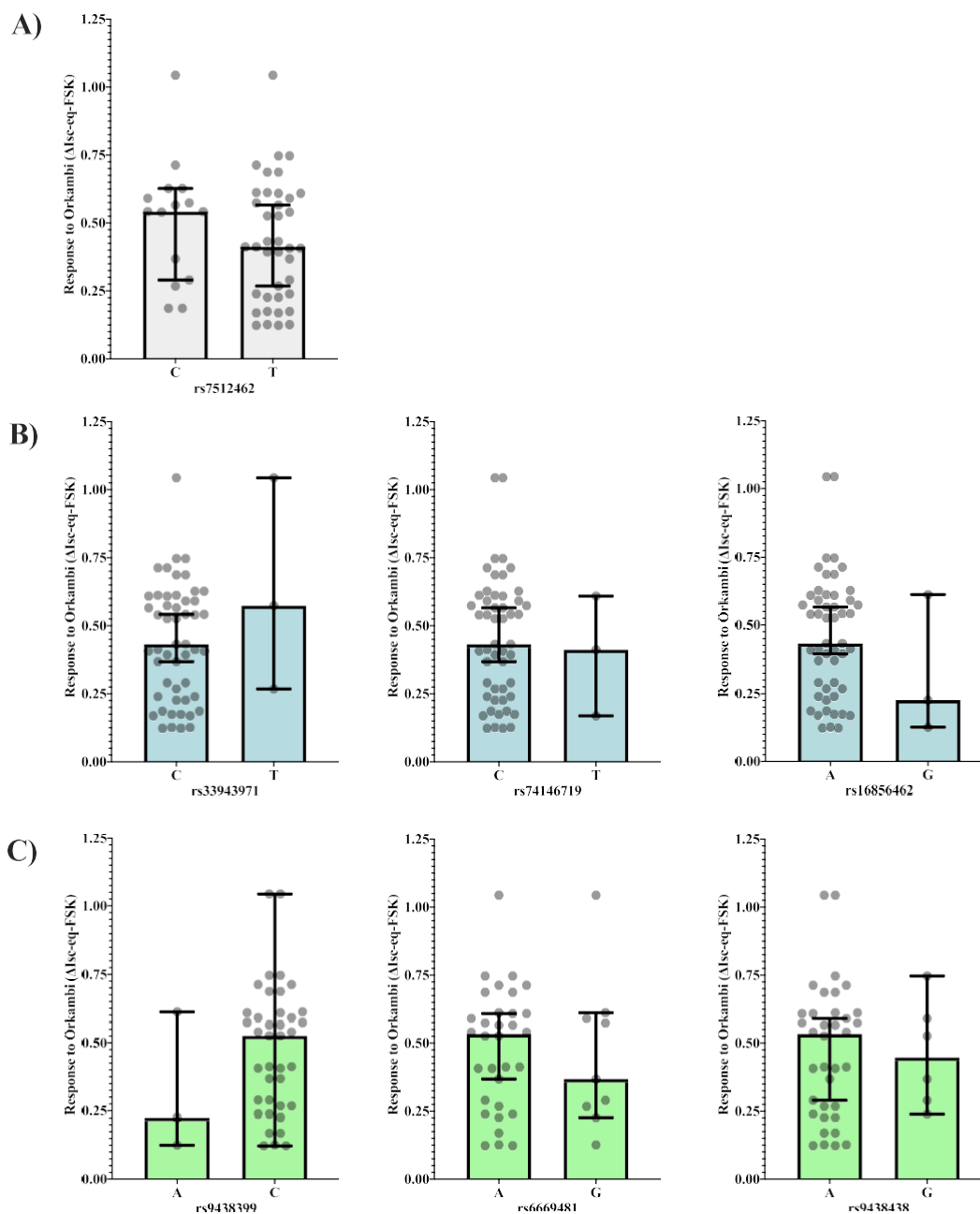


Fig. 2. Association between the alleles of the single nucleotide variants in the *Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)* gene with Δ Isc-eq-FSK (μ A/cm²) for the response to the Orkambi® (VX-809 + VX-770). (A) We presented the information for the rs7512462 alleles. (B) We presented the information for the alleles of the exonic variants in the *SLC26A9* gene. (C) We presented the information for the alleles of the 3' untranslated region (UTR) variants in the *SLC26A9* gene. We did not observe any significant difference ($P > 0.05$) in response to the Orkambi® regarding the screened variants in the *SLC26A9* gene. Δ Isc-eq-FSK: equivalent short-circuit current-forskolin.

prognosis due to the absence of CFTR expression (Bareil and Bergougnoux, 2020).

Curiously, among the thirty genetic variants identified in our study in the *SLC26A6* gene, none were considered pathogenic according to ACMG guidelines, and ten were classified with uncertain significance. When the association between the genotypes and the disease condition is unclear or not strong, it is important to assess the possible impact of the sequence variants on the gene sequence or the protein with bioinformatics tools (Richards et al., 2015). Here, we used eight tools to evaluate *SLC26A9* gene variants, and all three exonic variants had deleterious predictions in only one or two tools. Interestingly, rs33943971 was previously described in two patients with diffuse bronchiectasis, and rs16856462 was found in a patient with the

autoimmune polyendocrine syndrome (Bakouh et al., 2013; Calvete et al., 2021).

Although there were no deleterious predictions for the three 3' UTR variants found in our patients with CF, variants in this region were associated with increased risk for asthma (rs12031234, rs2282429, rs2282430) and sporadic Parkinson's disease (rs6669481) (Anagnostopoulou et al., 2012; Sandor et al., 2017). Concerning intronic variants, nine of 24 showed one or two deleterious predictions or possible alterations in splicing. The unique variant with the greater number of deleterious predictions was rs11240593, formerly described in patients with diffuse bronchiectasis (Bakouh et al., 2013). In addition, rs3811426, rs3811427, rs11240591, rs7366204, and rs12759719 variants were also reported in patients with diffuse bronchiectasis (Bakouh

et al., 2013). The intronic variant rs11240594 was associated with the olanzapine processing speed and the improvement in the neurocognitive function in patients with schizophrenia (McClay et al., 2011).

In patients with CF, studies with the intronic variant rs7512462 in the *SLC26A9* gene showed its association with pancreatic damage, higher neonatal immunoreactive trypsinogen, CF-related diabetes, and meconium ileus (Miller et al., 2015). Other variants in the *SLC26A9* gene also correlated with meconium ileus, pancreatic damage, and CF-related diabetes (Miller et al., 2015; Aksit et al., 2022). All CF-related disease-associated variants were within non-coding regions, either intronic or 5' UTR region of the gene (Pereira et al., 2017; Pereira et al., 2018; Lam et al., 2020).

Since some studies were divergent as for the association of the C allele in rs7512462 and the Ivacaftor®/VX-770-induced improvement of pulmonary function in patients with CF harboring p.Gly551Asp *CFTR* genotype (Corvol et al., 2018; Eastman et al., 2021), it was worth investigating *CFTR* function *in vitro* in the HNE cell culture, recently considered the gold-standard model for drug responsiveness to CF (Pedemonte, 2022). Our previous work suggested a relation between the allele C (and the genotypes with this allele – combined analysis) from rs7512462 and a better response to *CFTR* modulation drugs (Ivacaftor®/VX-770, Lumacaftor®/VX-809, and their combination into Orkambi®) (Kmit et al., 2019). However, in the current report, we did not find any significant association between *in vitro* *CFTR* response to Orkambi® and the 30 variants screened in the *SLC26A9* gene, nor in analyses with genotypes and alleles. More studies should be done to solve the ambiguous response of the CF phenotype and drug response to the precision and personalized medicine regarding the *SLC26A9* gene variability and its protein activities (Anagnostopoulou et al., 2012; Bakouh et al., 2013; Liu et al., 2015; Miller et al., 2015; Pereira et al., 2017; Balázs and Mall, 2018; Corvol et al., 2018; Pereira et al., 2018; Kmit et al., 2019; Lam et al., 2020; Pinto et al., 2021b; Gorrieri et al., 2022; Calvete et al., 2021; Eastman et al., 2021; Larsen et al., 2021; Jo et al., 2022; Gong et al., 2022; Li et al., 2022).

Our study has a small sample, however, it was pioneer research in sequencing the *SLC26A9* gene in patients with CF, in order to determine the possible variants in the *SLC26A9* gene that can be associated with the response to precision and personalized therapy using *CFTR* modulators.

5. Conclusions

In this current research, although 30 *SLC26A9* SNVs were described among the nine patients with CF, none was a well-known pathogenic variant. Furthermore, we did not detect associations from the 30 *SLC26A9* variants and the response to the Orkambi® *in vitro*. Our study had some limitations, namely the low number of patients (type II error) and the absence of the sequencing of the 5' UTR region and the first non-coding exon of the *SLC26A9* gene. In addition, we focused on chloride transport through HNE cells, however, the *SLC26A9* channel may also contribute to bicarbonate secretion, and the impact of Orkambi® on this anion should also be accessed in the future (Larsen et al., 2021). Yet, we hoped to shed light on the importance of precision medicine and *in vitro* studies with the *SLC26A9* channel as a therapeutic opportunity for patients with CF. Future *in vivo* studies should reinforce this importance as well.

6. Ethics approval

The participants or their legal guardians signed the Informed Consent Form under the approval of the Ethics Committee from the University of Campinas (Unicamp) (no 948.757/2015 and no 91.041.317/2019). The procedures were performed in accordance with the Helsinki.

7. Consent to participate

The participants or their legal guardians signed the Informed Consent Form under the approval of the Ethics Committee from the Unicamp (no 948.757/2015 and no 91.041.317/2019).

8. Code availability

Not required.

9. Authors' contributions

(LGS, SV-NP, AHPK, LCB, CSB, TNM, and FALM) made substantial contributions to the study conception and design; and performed the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work. (LGS, TNM, and FALM) performed the formal analysis of the data collection. (SV-NP, AHPK, LCB, CSB, and JDR) performed the validation and visualization of the data. (LGS, JDR, TNM, and FALM) drafted the work and revised it critically for important intellectual content. (LGS, SV-NP, AHPK, LCB, CSB, JDR, TNM, and FALM) gave the final approval for the version to be published. (LGS, TNM, and FALM) wrote the original draft, and revised and edited the final manuscript before its submission. (FALM) was responsible to manage the project. (TNM and FALM) were responsible to supervise the study and to correct the page-proof.

Funding

The authors did not receive financial support to perform the study.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

We submitted the entire material as supplementary. Also, the crude table can be obtained on request from the corresponding author.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147428>.

References

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., et al., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>.
- Aksit, M.A., Ling, H., Pace, R.G., Raraigh, K.S., Onchiri, F., Faino, A.V., et al., 2022. Pleiotropic modifiers of age-related diabetes and neonatal intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Gene* 109, 1894–1908. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.09.004>.
- Amaral, M.D., Harrison, P.T., 2022. Development of novel therapeutics for all individuals with CF (the future goes on). *J. Cyst. Fibros.* <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.10.007> (Epub ahead of print).
- Anagnostopoulou, P., Riederer, B., Duerr, J., Michel, S., Binia, A., Agrawal, R., et al., 2012. *SLC26A9*-mediated chloride secretion prevents mucus obstruction in airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 122, 3629–3634. <https://doi.org/10.1172/JCI60429>.
- Bakouh, N., Bienvenu, T., Thomas, A., Ehrenfeld, J., Liote, H., Roussel, D., et al., 2013. Characterization of *SLC26A9* in patients with CF-like lung disease. *Hum. Mutat.* 34, 1404–1414. <https://doi.org/10.1002/humu.22382>.
- Balázs, A., Mall, M.A., 2018. Role of the *SLC26A9* chloride channel as disease modifier and potential therapeutic target in cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 9, 1112. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01112>.
- Bareil, C., Bergougnoux, A., 2020. *CFTR* gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Arch. Pediatr.* 27, eS8–eS12. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(20\)30044-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(20)30044-0).
- Bendl, J., Stourac, J., Salanda, O., Pavelka, A., Wieben, E.D., Zendulka, J., et al., 2014. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related

- mutations. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003440 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003440>.
- Bendl, J., Musil, M., Štourač, J., Zendulka, J., Damborský, J., Brezovský, J., 2016. PredictSNP2: a unified platform for accurately evaluating SNP effects by exploiting the different characteristics of variants in distinct genomic regions. *PLoS Comput. Biol.* 12, e1004962 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004962>.
- Bertrand, C.A., Zhang, R., Pilewski, J.M., Frizzell, R.A., 2009. SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia. *J. Gen. Physiol.* 133, 421–438. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810097>.
- Butnariu, L.I., Țarcă, E., Cojocaru, E., Rusu, C., Moişă, Ș.M., Leon Constantin, M.M., et al., 2021. Genetic modifying factors of cystic fibrosis phenotype: a challenge for modern medicine. *J. Clin. Med.* 10, 5821. <https://doi.org/10.3390/jcm10245821>.
- Calvete, O., Reyes, J., Valdés-Socin, H., Martin, P., Marazuela, M., Barroso, A., et al., 2021. Alterations in SLC4A2, SLC26A7 and SLC26A9 Drive acid-base imbalance in gastric neuroendocrine tumors and uncover a novel mechanism for a co-occurring polyautoimmune scenario. *Cells* 10, 3500. <https://doi.org/10.3390/cells10123500>.
- Choi, Y., Chan, A.P., 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31, 2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>.
- Corvol, H., Mésinè, J., Doukseh, I.-H., Strug, L.J., Boëlle, P.-Y., Guillot, L., 2018. SLC26A9 gene is associated with lung function response to ivacaftor in patients with cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 9, 828. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00828>.
- Cunningham, F., Allen, J.E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M., et al., 2022. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 50, D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>.
- de Azevedo, L.V.F., Cruz, F.C.R.M., Martins, J.P., Marson, F.A.L., 2023. Cystic fibrosis: a descriptive analysis of deaths in a two-decade period in Brazil according to age, race, and sex. *Diagnostics (Basel)* 13, 763. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040763>.
- Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C., 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67.
- Eastman, A.C., Pace, R.G., Dang, H., Aksit, M.A., Vecchio-Pagán, B., Lam, A.N., et al., 2021. SLC26A9 SNP rs7512462 is not associated with lung disease severity or lung function response to ivacaftor in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR. *J. Cyst. Fibros.* 20, 851–856. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.02.007>.
- Feng, L.B., Grosse, S.D., Green, R.F., Fink, A.K., Sawicki, G.S., 2018. Precision medicine in action: the impact of Ivacaftor on cystic fibrosis-related hospitalizations. *Health Aff. (Millwood)* 37, 773–779. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2017.1554>.
- Gentzsch, M., Mall, M.A., 2018. Ion channel modulators in cystic fibrosis. *Chest* 154, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.04.036>.
- Gong, J., He, G., Wang, C., Bartlett, C., Panjwani, N., Mastromatteo, S., et al., 2022. Genetic evidence supports the development of SLC26A9 targeting therapies for the treatment of lung disease. *NPJ Genom. Med.* 7, 28. <https://doi.org/10.1038/s41525-022-00299-9>.
- Gorrieri, G., Zara, F., Scudieri, P., 2022. SLC26A9 as a potential modifier and therapeutic target in cystic fibrosis lung disease. *Biomolecules* 12, 202. <https://doi.org/10.3390/biom12020202>.
- Haq, I., Almuhem, M., Soars, S., Poulton, D., Brodrie, M., 2022. Precision medicine based on CFTR genotype for people with cystic fibrosis. *Pharmgenomics Pers. Med.* 15, 91–104. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S245603>.
- Jo, S., Centeio, R., Park, J., Ousingsawat, J., Jeon, D.K., Talbi, K., et al., 2022. The SLC26A9 inhibitor S9-A13 provides no evidence for a role of SLC26A9 in airway chloride secretion but suggests a contribution to regulation of ASL pH and gastric proton secretion. *FASEB J.* 36, e22534.
- Kmit, A., Marson, F.A.L., Pereira, S.V., Vinagre, A.M., Leite, G.S., Servidoni, M.F., et al., 2019. Extent of rescue of F508del-CFTR function by VX-809 and VX-770 in human nasal epithelial cells correlates with SNP rs7512462 in SLC26A9 gene in F508del/F508del Cystic Fibrosis patients. *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.* 1865, 1323–1331.
- Lam, A.N., Aksit, M.A., Vecchio-Pagan, B., Shelton, C.A., Osorio, D.L., Anzmann, A.F., et al., 2020. Increased expression of anion transporter SLC26A9 delays diabetes onset in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 130, 272–286. <https://doi.org/10.1172/JCI129833>.
- Landrum, M.J., Chitipiralla, S., Brown, G.R., Chen, C., Gu, B., Hart, J., et al., 2020. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res.* 48, D835–D844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz972>.
- Larsen, M.B., Choi, J.J., Wang, X., Myerburg, M.M., Frizzell, R.A., Bertrand, C.A., 2021. Separating the contributions of SLC26A9 and CFTR to anion secretion in primary human bronchial epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 321, L1147–L1160. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00563.2020>.
- Li, T., di Stefano, G., Raza, G.S., Sommerer, I., Riederer, B., Römermann, D., et al., 2022. Hydrokinetic pancreatic function and insulin secretion are modulated by Cl⁻ uniporter SLC26A9 in mice. *Acta Physiol. (Oxf.)* 234, e13729. <https://doi.org/10.1111/apha.13729>.
- Liu, X., Li, T., Riederer, B., Lenzen, H., Ludolph, L., Yeruva, S., et al., 2015. Loss of SLC26A9 anion transporter alters intestinal electrolyte and HCO₃⁻ transport and reduces survival in CFTR-deficient mice. *Pflügers Arch.* 467, 1261–1275. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1543-x>.
- Lopes-Pacheco, M., 2020. CFTR Modulators: the changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front. Pharmacol.* 10, 1662. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01662>.
- Marson, F.A.L., Bertuzzo, C.S., Ribeiro, J.D., 2017. Personalized or precision medicine? The example of cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 8, 390. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00390>.
- McClay, J.L., Adkins, D.E., Aberg, K., Bukszár, J., Khachane, A.N., Keefe, R.S., et al., 2011. Genome-wide pharmacogenomic study of neurocognition as an indicator of antipsychotic treatment response in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 36, 616–626. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.193>.
- Mésinè, J., Ruffin, M., Guillot, L., Boëlle, P.Y., Corvol, H., On Behalf Of The French CF Modifier Gene Study Investigators, 2022. Factors predisposing the response to Lumacaftor/Ivacaftor in people with cystic fibrosis. *J. Pers. Med.* 12, 252. <https://doi.org/10.3390/jpm12020252>.
- Miller, M.R., Soave, D., Li, W., Gong, J., Pace, R.G., Boëlle, P.Y., 2015. Variants in solute carrier SLC26A9 modify prenatal exocrine pancreatic damage in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 166, 1152–1157.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.01.044>.
- Ng, P.C., Henikoff, S., 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 11, 863–874. <https://doi.org/10.1101/gr.176601>.
- Pedemonte, N., 2022. Nasal epithelial cells as a gold-standard predictive model for personalized medicine in cystic fibrosis. *J. Physiol.* 600, 1285–1286. <https://doi.org/10.1113/JP282586>.
- Pereira, S.V.N., Ribeiro, J.D., Bertuzzo, C.S., Marson, F.A.L., 2017. Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1 and SLC9A3). *Gene* 629, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.068>.
- Pereira, S.V.N., Ribeiro, J.D., Bertuzzo, C.S., Marson, F.A.L., 2018. Interaction among variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1, and SLC9A3) and CFTR mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 53, 888–900. <https://doi.org/10.1002/ppul.24005>.
- Pinto, M.C., Quaresma, M.C., Silva, I.A.L., Railean, V., Ramalho, S.S., Amaral, M.D., 2021a. Synergy in cystic fibrosis therapies: targeting SLC26A9. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13064. <https://doi.org/10.3390/ijms222313064>.
- Pinto, M.C., Silva, I.A.L., Figueira, M.F., Amaral, M.D., Lopes-Pacheco, M., 2021b. Pharmacological modulation of ion channels for the treatment of cystic fibrosis. *J. Exp. Pharmacol.* 13, 693–723. <https://doi.org/10.2147/JEP.S255377>.
- Quesada, R., Dutzler, R., 2020. Alternative chloride transport pathways as pharmacological targets for the treatment of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 19, S37–S41. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.020>.
- Rentzsch, P., Schubach, M., Shendure, J., Kircher, M., 2021. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 13, 31. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00835-9>.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 17, 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Sandor, C., Honti, F., Haerty, W., Szewczyk-Krolikowski, K., Tomlinson, P., Evetts, S., 2017. Whole-exome sequencing of 228 patients with sporadic Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 7, 41188. <https://doi.org/10.1038/srep41188>.
- Sato, Y., Thomas, D.Y., Hanrahan, J.W., 2019. The anion transporter SLC26A9 localizes to tight junctions and is degraded by the proteasome when co-expressed with F508del-CFTR. *J. Biol. Chem.* 294, 18269–18284. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010192>.
- Sepahzad, A., Morris-Rosendahl, D.J., Davies, J.C., 2021. Cystic fibrosis lung disease modifiers and their relevance in the new era of precision medicine. *Genes (Basel)* 12, 562. <https://doi.org/10.3390/genes12040562>.
- Shihab, H.A., Gough, J., Mort, M., Cooper, D.N., Day, I.N., Gaunt, T.R., 2014. Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts. *Hum. Genomics* 8, 11. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-8-11>.
- Skov, M., Hansen, C.R., Pressler, T., 2019. Cystic fibrosis - an example of personalized and precision medicine. *APMIS* 127, 352–360. <https://doi.org/10.1111/apm.12915>.
- Steinhaus, R., Proft, S., Schuelke, M., Cooper, D.N., Schwarz, J.M., Seelow, D., 2021. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res.* 49, W446–W451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab266>.

Title: Identification of Single Nucleotide Variants in *SLC26A9* Gene in Patients with Cystic Fibrosis (p.Phe508del Homozygous) and its Association to Orkambi® (Lumacaftor and Ivacaftor) Response *in vitro*

Running title: Orkambi and *SLC26A9*

Luana Gavioli Santos; Stéphanie Villa-Nova Pereira; Arthur Henrique Pezzo Kmit; Luciana Cardoso Bonadia; Carmen Sílvia Bertuzzo; José Dirceu Ribeiro; Taís Nitsch Mazzola; Fernando Augusto Lima Marson

Supplementary Table 1. Primers used for Sanger sequencing of the <i>Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)</i> gene.				
Exon	—	Primers 5' → 3'		Size
		Forward	Reverse	(base pairs)
2		CTTGAGGTCATCTCAGCTATCC	CATCATTCAGAACCTCACTTCC	783
3 and 4		GAGCAGGATATGATAATCCCTC	TAGGACTGACCAGGAACAACCTC	587
5		GCCACTACAGGGACATTTGGAC	GCCCCCTAAATCAGATTTAGCATC	610
6		CAGCCATGTAGAGCACAGTGAA	CCTCAGAATCCTCTCTGAACAAC	475
7 and 8		GTCTTGGTGTGCCTCCATTAG	CAGTTTCGACTGCACTTTCA	748
9		GAAGACCACATAGCACCAAAG	GGCCTAAGACCTGAGAGTGAC	692
10 and 11		CACTGGGTCACCTCAGGTC	GCCTCACTATGGACAAGGTTAC	724
12		GAGTCTAATCCCTAGGCAACATT	CCAGCAGATGGCTGAGTTAG	606
13		CCTTGGCTAATCCAGGAAGACT	TGGAAGGTACAGTGGACTAAGC	287
14, 15 and 16		GTGAGGACAGGACCCCATC	GTAACAGGGGGCAGTATCAG	713
17		GTCTGTGTTACCATCACCG	GGAGAATGTCTCAACCTGGTG	588
18		GAAGTGGTGTGCTTTGCTGCTA	CTCTTTGGACTTGTACCTGAAGC	378
19		GATATTGCACTGCCAATGCC	GGAACCTAAACCTTCTCCTGTG	399
20		GACAAAGCAGGCAAAGTGAG	CTGGAGGTGAGACAGCTGAGTG	541
21 e 22		CTCTTGGTTGCAGCCACTGTG	GGTGTGGAGAGCACATGGTC	687

Supplementary Table 2. Genomic and protein coordinates of the variants found in the *Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)* gene.

dbSNP	Nucleotide	Protein position	Genomic coordinate		Protein coordinates
			GRCh37.p13	GRCh38.p13	
Exonic variants					
rs33943971	c.540C>T	p.Thr180=	1,205901000,G,A	1,205931872,G,A	ENSP00000356103.3 T T
rs74146719	c.1817C>T	p.Pro606Leu	1,205890932,G,A	1,205921804,G,A	ENSP00000356103.3 P L
rs16856462	c.2243A>G	p.His748Arg	1,205887981,T,C	1,205918853,T,C	ENSP00000356103.3 H R
3' UTR					
rs9438399	c.*297C>A	p.Thr832=	1,205884188,G,T	1,205915060,G,T	ENSP00000356103.3 T T
rs6669481	c.*211A>G	p.Arg804Gly	1,205884274,T,C	1,205915146,T,C	ENSP00000356103.3 R G
rs9438438	c.*423A>G	p.Pro874=	1,205884062,T,C	1,205914934,T,C	ENSP00000356103.3 P P
Intronic variants					
rs185066190	c.1294-174T>C	NA	1,205895932,A,G	1,205926804,A,G	NA
rs11240593	c.2111-30C>G	NA	1,205888143,G,C	1,205919015,G,C	NA
rs12036341	c.954-241T>G	NA	1,205897418,A,C	1,205928290,A,C	NA
rs12143020	c.954-231G>A	NA	1,205897408,C,T	1,205928280,C,T	NA
rs16856489	c.1294-232A>T	NA	1,205895990,T,A	1,205926862,T,A	NA
rs3811426	c.1659+48G>A	NA	1,205892415,C,T	1,205923287,C,T	NA
rs3811427	c.1659+52A>G	NA	1,205892411,T,C	1,205923283,T,C	NA
rs146595142	c.2257-202T>A	NA	1,205886684,A,T	1,205917556,A,T	NA
rs41264907	c.2257-165G>A	NA	1,205886647,C,T	1,205917519,C,T	NA
rs11240591	c.2328+30G>A	NA	1,205886381,C,T	1,205917253,C,T	NA
rs74739480	c.-18-310G>A	NA	1,205905276,C,T	1,205936148,C,T	NA
rs3811423	c.376+42C>A	NA	1,205901788,G,T	1,205932660,G,T	NA
rs28661171	c.376+44A>C	NA	1,205901786,T,G	1,205932658,T,G	NA
rs11240594	c.1293+104C>T	NA	1,205896235,G,A	1,205927107,G,A	NA
rs3811424	c.1101+82T>C	NA	1,205896948,A,G	1,205927820,A,G	NA
rs7366204	c.1216-59G>A	NA	1,205896475,C,T	1,205927347,C,T	NA
rs73082393	c.1293+46A>C	NA	1,205896293,T,G	1,205927165,T,G	NA
rs9438404	c.1294-168G>A	NA	1,205895926,C,T	1,205926798,C,T	NA
rs12083912	c.1567-25C>T	NA	1,205892580,G,A	1,205923452,G,A	NA
rs12759719	c.2055+15A>G	NA	1,205890679,T,C	1,205921551,T,C	NA
rs12082235	c.1774-13C>A	NA	1,205890988,G,T	1,205921860,G,T	NA
rs17348561	c.2110+96G>A	NA	1,205889208,C,T	1, 205920080,C,T	NA
rs74146718	c.2056-133G>A	NA	1,205889491,C,T	1,205920363,C,T	NA
rs6421774	c.2257-331G>T	NA	1,205886813,C,A	1,205917685,C,A	NA

3' UTR: 3' Untranslated Region; dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database; NA: Not Applicable.

Supplementary Table 3. *In silico* computational predictors analyses of the intronic variants found in the *Solute Carrier Family 26, member 9 (SLC26A9)* gene.

dbSNP	PredictSNP2 ^a	Mutation taster 2021 ^b	CADD ^c	Fathmm		Human splicing finder ^f
				MKL ^d	XF ^e	
rs74739480	Neutral (−1)	Benign	Benign (3.84)	Benign (0.20)	Benign (0.04)	No significant impact on splicing signals
rs3811423	Neutral (−1)	Benign	Benign (0.79)	Benign (0.07)	Benign (0.03)	No significant impact on splicing signals
rs28661171	Neutral (−1)	Benign	Benign (0.55)	Benign (0.11)	Benign (0.03)	No significant impact on splicing signals
rs11240594	Neutral (−0.46)	Benign	Benign (3.65)	Benign (0.13)	Benign (0.03)	No significant impact on splicing signals
rs3811424	Neutral (−1)	Benign	Benign (1.83)	Benign (0.13)	Benign (0.05)	No significant impact on splicing signals
rs7366204	Neutral (−1)	Benign	Benign (6.86)	Benign (0.08)	Benign (0.02)	No significant impact on splicing signals
rs73082393	Neutral (−1)	Benign	Benign (4.68)	Benign (0.19)	Benign (0.06)	No significant impact on splicing signals
rs9438404	Neutral (−0.20)	Benign	Benign (5.73)	Benign (0.13)	Benign (0.02)	No significant impact on splicing signals
rs12083912	Neutral (−1)	Benign	Benign (2.53)	Benign (0.20)	Benign (0.09)	No significant impact on splicing signals
rs12759719	Neutral (−1)	Benign	Benign (2.79)	Benign (0.07)	Benign (0.02)	No significant impact on splicing signals
rs12082235	Neutral (−1)	Benign	Benign (7.06)	Benign (0.20)	Benign (0.15)	No significant impact on splicing signals
rs17348561	Neutral (−1)	Benign	Benign (0.84)	Benign (0.15)	Benign (0.03)	No significant impact on splicing signals
rs74146718	Neutral (−1)	Benign	Benign (1.15)	Benign (0.17)	Benign (0.02)	No significant impact on splicing signals
rs6421774	Neutral (−1)	Benign	Benign (4.69)	Benign (0.11)	Benign (0.01)	No significant impact on splicing signals

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database; CADD: Combined Annotation Dependent Depletion; Fathmm-XF: Fathmm-eXtended Features; Fathmm-MKL: Fathmm-Multiple-Kernel Learning.

^a: <https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp2/> (Bendl et al., 2016);

^b: <https://www.genecascade.org/MutationTaster2021/#transcript> (Steinhaus et al., 2021);

^c: <https://cadd.gs.washington.edu/snv> (Rentzsch et al., 2021);

^d: <http://fathmm.biocompute.org.uk/fathmmMKL.htm> (Shihab et al., 2014);

^e: <http://fathmm.biocompute.org.uk/fathmm-xf/> (Shihab et al., 2014);

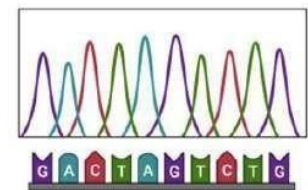
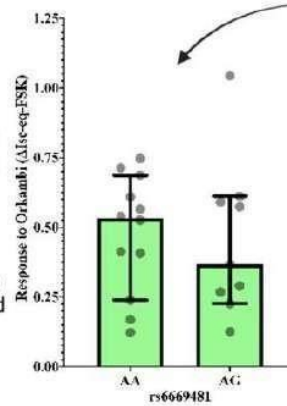
^f: <http://umd.be/Redirect.html> (Desmet et al., 2009).

Identification of Single Nucleotide Variants in *SLC26A9* Gene in Patients with Cystic Fibrosis (p.Phe508del Homozygous) and its Association to Orkambi® (Lumacaftor and Ivacaftor) Response *in vitro*

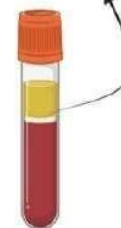
(C) HNE cells cultures were incubated with the CFTR corrector (VX-809) or DMSO. The CFTR function was measured using Forskolin, and the Isc-eq was calculated with the addition of the CFTR potentiator (VX-770) and the CFTR channel inhibitor.



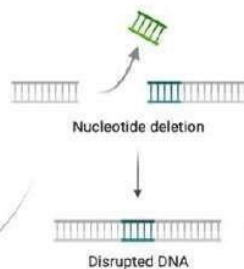
(F) The Orkambi® response *in vitro* was compared between the genotypes and alleles of the *SLC26A9* variants and we did not find any significant association.



(E) *SLC26A9* gene sequencing was performed. We found 24 variants in intronic regions, three in the exonic regions [two missenses (rs74146719 and rs16856462) and one synonymous (rs33943971)], and three in the 3' UTR (rs9438399, rs6669481, and rs9438438). The sequencing variants were evaluated by *in silico* prediction tools.



(B) HNE cells were collected to perform the cell culture, and evaluate CFTR function *in vitro* (response to Orkambi®)



(A) Nine patients with cystic fibrosis (p.Phe508del/p.Phe508del genotype) were enrolled in the study.

(D) Blood was collected to extract the DNA.

CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, embora 30 SNVs tenham sido descritos no gene *SLC26A9* dentre os nove pacientes com FC, nenhum foi descrito como sendo uma variante com caráter de patogenicidade. Além disso, não detectamos associações das 30 variantes no *SLC26A9* e a resposta ao Orkambi® *in vitro*. Nosso estudo teve algumas limitações, nomeadamente o baixo número de doentes (erro tipo II) e a ausência do sequenciamento da região 5' UTR e da primeira região não codificante éxon do gene *SLC26A9*. Além disso, nosso estudo focou na função de transporte de íons cloreto transporte na análise de culturas das células epiteliais nasais humanas, no entanto, o canal *SLC26A9* também pode contribuir para a secreção de bicarbonato, e o impacto de Orkambi® neste ânion também deve ser acessado no futuro (Larsen et al., 2021). No entanto, nós esperamos lançar luz sobre a importância da medicina de precisão e dos estudos *in vitro* com o canal *SLC26A9* como uma oportunidade terapêutica para pacientes com CF. Futuros estudos *in vivo* devem reforçar essa importância também.

REFERÊNCIAS

1. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 1999;79(1):S3-S22. doi: 10.1152/physrev.1999.79.1.S3.
2. Navarro S. Recopilación histórica de la fibrosis quística [Historical compilation of cystic fibrosis]. *Gastroenterol Hepatol.* 2016;39(1):36-42. doi: 10.1016/j.gastrohep.2015.04.012.
3. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000;67(2):117-33. doi: 10.1159/000029497.
4. Chen Q, Shen Y, Zheng J. A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal Model Exp Med.* 2021;4(3):220-32. doi: 10.1002/ame2.12180.
5. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front Pharmacol.* 2020;10:1662. doi: 10.3389/fphar.2019.01662.
6. European Cystic Fibrosis Society 2022. ECFS Patient Registry: Introduction. *In: ECFS Patient Registry: Introduction.* [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.ecfs.eu/ecfspr>. Acesso em: 5 abr. 2023.
7. Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. Registro Brasileiro de Fibrose Cística. 2018. Acesso em 21/04/2021: http://portalgbefc.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC_2018.pdf
8. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989;245(4922):1073-80. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2570460>.
9. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245(4922):1066-73.
10. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989;245(4922):1059-65. doi: 10.1126/science.2772657
11. Mall MA, Hartl D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J.* 2014;44(4):1042-54. doi: 10.1183/09031936.00228013.
12. Butnariu LI, Țarcă E, Cojocaru E, Rusu C, Moisă ȘM, Leon Constantin MM, Gorduza EV, Trandafir LM. Genetic modifying factors of cystic fibrosis phenotype: A challenge for modern medicine. *J Clin Med.* 2021;10(24):5821. doi: 10.3390/jcm10245821.
13. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020;109(5):893-9. doi: 10.1111/apa.15155.

14. Cystic Fibrosis Foundantion. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Variant list history. 2020. Disponível em: https://cftr2.org/mutations_history. Acesso em: 18 abril de 2020.
15. Gong J, He G, Wang C, Bartlett C, Panjwani N, Mastromatteo S, Lin F, Keenan K, Avolio J, Halevy A, Shaw M, Esmaeili M, Côté-Maurais G, Adam D, Bégin S, Bjornson C, Chilvers M, Reisman J, Price A, Parkins M, van Wylick R, Berthiaume Y, Bilodeau L, Mateos-Corral D, Hughes D, Smith MJ, Morrison N, Brusky J, Tullis E, Stephenson AL, Quon BS, Wilcox P, Leung WM, Solomon M, Sun L, Brochiero E, Moraes TJ, Gonska T, Ratjen F, Rommens JM, Strug LJ. Genetic evidence supports the development of *SLC26A9* targeting therapies for the treatment of lung disease. NPJ Genom Med. 2022;7:28. doi: 10.1038/s41525-022-00299-9.
16. Sepahzad A, Morris-Rosendahl DJ, Davies JC. Cystic fibrosis lung disease modifiers and their relevance in the new era of precision medicine. Genes (Basel) 2021;12:562. doi: 10.3390/genes12040562.
17. Balázs A, Mall MA. Role of the *SLC26A9* chloride channel as disease modifier and potential therapeutic target in cystic fibrosis. Front. Pharmacol. 2018;9:1112. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01112>.
18. Gentzsch M, Mall MA. Ion channel modulators in cystic fibrosis. Chest 2018;154:383–93. doi: 10.1016/j.chest.2018.04.036.
19. Strug LJ, Stephenson AL, Panjwani N, Harris A. Recent advances in developing therapeutics for cystic fibrosis. Hum Mol Genet. 2018;27(R2):R173-R186. doi: 10.1093/hmg/ddy188.
20. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. Lancet Respir Med. 2016;4(8):662–74. doi: 10.1016/S2213-2600(16)00023-0.
21. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of *CFTR* mutation classes. Lancet Respir Med. 2016;4(8):e37-e8. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30188-6.
22. Egan ME. Genetics of cystic fibrosis: Clinical implications. Clin Chest Med. 2016;37(1):9-16. doi: 10.1016/j.ccm.2015.11.002.
23. Almughem FA, Aldossary AM, Tawfik EA, Alomary MN, Alharbi WS, Alshahrani MY, Alshehri AA. Cystic fibrosis: Overview of the current development trends and innovative therapeutic strategies. Pharmaceutics. 2020;12(7):616. doi: 10.3390/pharmaceutics12070616.
24. Pinto MC, Silva IAL, Figueira MF, Amaral MD, Lopes-Pacheco M. Pharmacological modulation of ion channels for the treatment of cystic fibrosis. J Exp Pharmacol. 2021;13:693–723. doi: 10.2147/JEP.S255377.
25. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. CFTR protein: Not just a chloride channel? Cells. 2021;10(11):2844. doi: 10.3390/cells10112844.

26. López-Valdez JA, Aguilar-Alonso LA, Gándara-Quezada V, Ruiz-Rico GE, Ávila- Soledad JM, Reyes AA, Pedroza-Jiménez FD. Cystic fibrosis: current concepts. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2021;78(6):584-96. doi: 10.24875/BMHIM.20000372.
27. Mésinèle J, Ruffin M, Guillot L, Corvol H. Modifier factors of cystic fibrosis phenotypes: A Focus on modifier genes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):14205. doi: 10.3390/ijms232214205.
28. Sathe M, Houwen R. Meconium ileus in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2017;16(2):S32-S39. doi: 10.1016/j.jcf.2017.06.007.
29. Singh VK, Schwarzenberg SJ. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2017;2:S70-S78. doi: 10.1016/j.jcf.2017.06.011.
30. BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº112, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2016. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Insuficiência Pancreática Exócrina. Brasília; 2016.
31. Kamal N, Surana P, Koh C. Liver disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2018;34(3):146-51. doi: 10.1097/MOG.0000000000000432.
32. Ode KL, Chan CL, Granados A, Moheet A, Moran A, Brennan AL. Cystic fibrosis related diabetes: Medical management. *J Cyst Fibros.* 2019;18(2):S10-S18. doi: 10.1016/j.jcf.2019.08.003.
33. Granados A, Chan CL, Ode KL, Moheet A, Moran A, Holl R. Cystic fibrosis related diabetes: Pathophysiology, screening and diagnosis. *J Cyst Fibros.* 2019;18(2):S3-S9. doi: 10.1016/j.jcf.2019.08.016.
34. O'Neal WK, Knowles MR. Cystic Fibrosis Disease Modifiers: Complex Genetics Defines the Phenotypic Diversity in a Monogenic Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2018;19:201-22. doi: 10.1146/annurev-genom-083117-021329.
35. Kuk K, Taylor-Cousar JL. Lumacaftor and ivacaftor in the management of patients with cystic fibrosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Respir Dis.* 2015;9(6):313-26. doi: 10.1177/1753465815601934.
36. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *J Pediatr.* 2017;181S:S4-S15.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064.
37. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Personalized or precision medicine? The example of cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2017;8:390. doi: 10.3389/fphar.2017.00390.

38. Cholon DM, Gentzsch M. Recent progress in translational cystic fibrosis research using precision medicine strategies. *J Cyst Fibros*. 2018;17(2S):S52-S60. doi: 10.1016/j.jcf.2017.09.005.
39. Polgreen PM, Comellas AP. Clinical phenotypes of cystic fibrosis carriers. *Annu Rev Med*. 2022;73:563-74. doi: 10.1146/annurev-med-042120-020148.
40. Quesada R, Dutzler R. Alternative chloride transport pathways as pharmacological targets for the treatment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2020;19:S37–S41. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.020>.
41. Terlizzi V, Lucarelli M, Salvatore D, Angioni A, Bisogno A, Braggion C, Buzzetti R, Carnovale V, Casciaro R, Castaldo G, Cirilli N, Collura M, Colombo C, Di Lullo AM, Elce A, Lucidi V, Madarena E, Padoan R, Quattrucci S, Raia V, Seia M, Termini L, Zarrilli F. Clinical expression of cystic fibrosis in a large cohort of Italian siblings. *BMC Pulm Med*. 2018;18(1):196. doi: 10.1186/s12890-018-0766-6.
42. Guillot L, Tabarya O, Le Rouzic P, Clement A, Corvol H. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:83-93. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.011.
43. Marson FAL, Bertuzzo CS, Hortencio TDR, Ribeiro JD, Bonadia LC, Ribeiro AF. The *ACE* gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2012;12:1. doi: 10.1186/1471-2466-12-41.
44. 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. doi: 10.1186/1471-2466-12-50.
45. Lima CSP, 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;38:50-56. doi: 10.1590/s1806-37132012000100008.
46. Furgeri DT, Marson FAL, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Association between the IVS4G>T mutation in the *TCF7L2* gene and susceptibility to diabetes in cystic fibrosis patients. *BMC Res Notes*. 2012;5:561. doi: 10.1186/1756-0500-5-561.
47. Marson FAL, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Genetic interaction of *GSH* metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Med Genet*. 2013;14:60. doi: 10.1186/1471-2350-14-60.
48. Marson FAL, Marcelino ARB, Rezende LM, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. The *IFRD1* (57460C>T polymorphism) gene: a negative report in cystic fibrosis clinical severity. *J Mol Genet Med*. 2013;7:1000058.
49. Marson FAL, Marcelino ARB, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. *COX-2* gene polymorphisms: genetic determinants of cystic fibrosis comorbidities. *Int J Genet*. 2013;5:132-8. doi: 10.9735/0975-2862.5.1.132-138.

50. Rezende LM, Furgeri DT, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. ADRA2A is a cystic fibrosis modifier gene. *Int J Genet*. 2013;5:125-32.
51. Marson FAL, 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. doi: 10.1186/1471-2350-15-27.
52. Marson FAL, Zimmerman LA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. *ADIPOR2* polymorphisms in cystic fibrosis are potential modifiers of clinical severity. *J Genet Syndr Gene*. 2014;05:246.
53. Coutinho CAAC, Marson FAL, Marcelino ARB, Bonadia LC, Carlin MP, Ribeiro AF et al. TNF-alpha polymorphisms as a potential modifier gene in the cystic fibrosis. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2014;5(2):87-99.
54. Furlan LL, Marson FAL, 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(8):881-94. doi: 10.1007/s00439-016-1684-4.
55. Pereira SVN, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the *SLC* gene family (*SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* and *SLC9A3*). *Gene* 2017;629:117-26. doi: 10.1016/j.gene.2017.07.068.
56. Kmit A, Marson FAL, Pereira SV, Vinagre AM, Leite GS, Servidoni MF, et al. Extent of rescue of F508del-CFTR function by VX-809 and VX-770 in human nasal epithelial cells correlates with SNP rs7512462 in *SLC26A9* gene in F508del/F508del cystic fibrosis patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019;1865:1323-31. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.01.029.
57. Gorrieri G, Zara F, Scudieri P. *SLC26A9* as a potential modifier and therapeutic target in cystic fibrosis lung disease. *Biomolecules*. 2022;12(2):202. doi: 10.3390/biom12020202.
58. Ousingsawat J, Centeio R, Schreiber R, Kunzelmann K. Expression of *SLC26A9* in airways and its potential role in asthma. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):2998. doi: 10.3390/ijms23062998.
59. Corvol H, Mésinè J, Douksieh IH, Strug LJ, Boëlle PY, Guillot L. *SLC26A9* gene is associated with lung function response to Ivacaftor in patients with cystic fibrosis. *Front Pharmacol*. 2018;9:828. doi: 10.3389/fphar.2018.00828.
60. Miller MR, Soave D, Li W, Gong J, Pace RG, Boëlle PY, Cutting GR, Drumm ML, Knowles MR, Sun L, Rommens JM, Accurso F, Durie PR, Corvol H, Levy H, Sontag MK, Strug LJ. Variants in solute carrier *SLC26A9* modify prenatal exocrine pancreatic damage in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2015;166(5):1152-7. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.01.044.
61. Pereira SVN, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. Interaction among variants in the *SLC* gene family (*SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1*, and *SLC9A3*) and *CFTR* mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(7):888-900. doi: 10.1002/ppul.24005.

62. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 17, 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
63. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2019;35(11):1978-80. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897.
64. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067. doi: 10.1093/nar/gkx1153.
65. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Bennett R, Berry A, Bhai J, Bignell A, Billis K, Boddu S, Brooks L, Charkhchi M, Cummins C, Da Rin Fioretto L, Davidson C, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui B, El Naboulsi T, Fatima R, Giron CG, Genev T, Martinez JG, Guijarro-Clarke C, Gymer A, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Marugán JC, Mohanan S, Mushtaq A, Naven M, Ogeh DN, Parker A, Parton A, Perry M, Piližota I, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Pérez-Silva JG, Stark W, Steed E, Sutinen K, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner MM, Szpak M, Thormann A, Tricomi FF, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Willhoft N, Winterbottom A, Wass E, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Giorgetti S, Haggerty L, Hunt SE, Ilesley GR, Loveland JE, Martin FJ, Moore B, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Dyer S, Harrison PW, Howe KL, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D988- D995. doi: 10.1093/nar/gkab1049.
66. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001;11(5):863-74. doi: 10.1101/gr.176601.
67. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
68. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics.* 2015;31(16):2745-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btv195.
69. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, Brezovsky J, Damborsky J. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(1):e1003440. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003440.

70. Bendl J, Musil M, Štourač J, Zendulka J, Damborský J, Brezovský J. PredictSNP2: A unified platform for accurately evaluating SNP effects by exploiting the different characteristics of variants in distinct genomic regions. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(5):e1004962. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004962.
71. Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Cooper DN, Schwarz JM, Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W446-W451. doi: 10.1093/nar/gkab266.
72. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D886-D894. doi: 10.1093/nar/gky1016.
73. Shihab HA, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day IN, Gaunt TR. Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts. *Hum Genomics*. 2014;8(1):11. doi: 10.1186/1479-7364-8-11.
74. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67. doi: 10.1093/nar/gkp215.