

## Doenças lisossomais de sobrecarga: da epidemiologia genética ao desenvolvimento de modelos de doença

### Lysosomal storage disorders: from genetic epidemiology to disease model development

Luciana Moreira<sup>1-3</sup>, Maria Francisca Coutinho<sup>1-3</sup>, Maria Eduarda Moutinho<sup>1-4</sup>, Matilde Barbosa Almeida<sup>1-3,5</sup>, Francisca Gonçalves<sup>1-4</sup>, Sofia Carvalho<sup>1-3,6</sup>, Olga Amaral<sup>1-3</sup>, Ana Joana Duarte<sup>1-3</sup>, Marisa Encarnação<sup>1-3</sup>, Paulo Gaspar<sup>7</sup>, Mariana Gonçalves<sup>1-3,8</sup>, Liliana Matos<sup>1-3</sup>, Diogo Ribeiro<sup>7</sup>, Hugo Rocha<sup>7</sup>, Juliana Inês Santos<sup>1-3</sup>, Sandra Alves<sup>1-3</sup>

sandra.alves@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação em Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Porto, Portugal

(2) Centro de Estudos de Ciência Animal. Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Laboratório Associado para a Ciência Animal e Veterinária, AI4Animals

(4) Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(5) Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(6) Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(7) Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(8) Centro de Investigação e Tecnologia em Ciências Agroambientais e Biológicas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

### \_Resumo

As doenças lisossomais de sobrecarga (DLS) são um grupo heterogéneo de cerca de 70 doenças metabólicas hereditárias raras, causadas por deficiências enzimáticas que comprometem a função do lisossoma, resultando em manifestações clínicas multissistémicas graves. Embora estejam disponíveis algumas abordagens terapêuticas, muitas DLS continuam sem opções eficazes de tratamento, e a validação funcional de variantes genéticas mantém-se um desafio na era da sequenciação de nova geração.

Neste trabalho, descrevemos a criação e caracterização de modelos experimentais inovadores para várias DLS, incluindo as Mucopolissacaridoses (MPS) I, II, IIIB, IIIC, IIID e VI e a Mucolipidose (ML) tipo II. Foram geradas linhas de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos (SHEDs) e células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), bem como modelos de peixe-zebra editados por CRISPR/Cas9. Estes sistemas recapitularam fenótipos típicos das doenças, como acumulação de glicosaminoglicanos e colesterol, défice enzimático e disfunção lisossomal.

Destacam-se a obtenção das primeiras linhas SHED para várias MPS, uma linha iPSC de ML II oficialmente registada (INSAi003-A) e a validação de modelos animais para MPS IIIB e ML II. Estes modelos constituem ferramentas complementares para estudar mecanismos patológicos, avaliar variantes de significado incerto e desenvolver terapias personalizadas, reforçando o papel do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge na investigação translacional de doenças raras.

### \_Abstract

Lysosomal storage diseases (LSDs) are a heterogeneous group of about 70 rare inherited metabolic disorders, resulting from enzymatic deficiencies that impair lysosomal function, leading to severe multisystemic clinical manifestations.

Although some therapeutic approaches exist, many LSDs still lack effective treatment options, and the functional validation of genetic variants remains a challenge in the era of next-generation sequencing. In this work, we

describe the creation and characterization of innovative experimental models for several LSDs, including Mucopolysaccharidoses (MPS) I, II, IIIB, IIIC and VI, and Mucolipidosis (ML) type II.

Stem cell lines from the dental pulp of exfoliated deciduous teeth (SHEDs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) were generated, and zebrafish models were engineered using CRISPR/Cas9. These systems recapitulated typical disease phenotypes, such as glycosaminoglycan and cholesterol accumulation, enzymatic deficiency, and lysosomal dysfunction. Highlights include the establishment of the first SHED lines for several MPSs, the first officially registered ML II iPSC line (INSAi003-A), and the validation of animal models for MPS IIIB and ML II.

These models represent complementary tools to study pathogenic mechanisms, evaluate variants of uncertain significance, and develop personalized therapies, reinforcing the National Health Institute Dr Ricardo Jorge role in translational research on rare diseases.

### \_Introdução

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS) constituem um grupo de doenças metabólicas hereditárias raras, causadas por variantes patogénicas que afetam a função do lisossoma e resultam na acumulação progressiva de substratos não degradados <sup>(1)</sup>. Estão descritas cerca de 70 DLS, todas monogénicas, maioritariamente autossómicas recessivas, embora três apresentem modo de transmissão ligado ao X. São, em geral, causadas por variantes patogénicas em genes que codificam hidrolases ácidas, proteínas de membrana do lisossoma, ou transportadores, levando à acumulação de

substratos não degradados no interior do lisossoma e comprometendo processos essenciais como a regulação do seu pH, a autofagia, a endocitose e a homeostasia do cálcio, entre outros (2,3).

A apresentação clínica destas doenças é altamente variável, podendo ir de formas neonatais graves a manifestações tardias ou assintomáticas. Em geral, são doenças multissistémicas, com envolvimento neurológico nas formas mais severas, levando a neurodegeneração, défice cognitivo, epilepsia e morte precoce. Outros sinais frequentes incluem hepatoesplenomegalia, alterações esqueléticas e cardiopatias (4). Apesar de individualmente raras (1:50.000–1:250.000), a sua prevalência conjunta varia entre 1:5.000–1:5.500 nados-vivos, sendo mais elevada em Portugal (cerca de 1:4.000), com incidências ainda superiores em algumas populações devido a efeitos fundadores (1,5-7). Dada a heterogeneidade clínica destas doenças e sobreposição de sintomas com outras patologias, o diagnóstico continua a ser um desafio. Isto é particularmente relevante uma vez que a ausência de diagnóstico atempado pode comprometer a eficácia das intervenções terapêuticas atualmente disponíveis. Embora ainda não exista cura, têm sido desenvolvidas várias abordagens terapêuticas, incluindo terapia de substituição enzimática (ERT), terapia de redução de substrato, chaperones farmacológicos e transplante de células hematopoiéticas (1,8). Estão também em desenvolvimento estratégias terapêuticas de base genética como terapia génica, terapias de RNA e edição genética (1,8,9). Atualmente, estão disponíveis em Portugal múltiplas terapias aprovadas para diferentes DLS, nomeadamente para a Doença de Fabry, Doença de Gaucher, Deficiência de Lipase Ácida Lisossomal, MPS I, II, IVA, VI e VII, Niemann-Pick tipo C e Doença de Pompe. Para a Alfa-Manosidose e para a Deficiência da Esfingomielinase Ácida também estão disponíveis no nosso país duas abordagens de ERT na modalidade de autorização de utilização especial. No entanto, a maioria das DLS continua sem tratamento eficaz, e as opções existentes não garantem resposta clínica sustentada.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem um papel central no diagnóstico bioquímico e molecular destas doenças, incluindo testes enzimáticos, doseamento de biomarcadores e diagnóstico molecular por sequenciação de Sanger e de nova geração (NGS), e tem contribuído, ao longo dos anos, com diversos estudos de caracterização de doentes portugueses (10-16). O INSA coordena ainda a Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga (CCTDLS), responsável pela avaliação e acompanhamento dos doentes com DLS em tratamento no nosso país. Segundo os dados publicados no relatório da CCTDLS de 2022, cerca de 350 doentes encontravam-se em tratamento em Portugal (17).

No domínio da investigação, o INSA, através do seu Departamento de Genética Humana (DGH), tem liderado vários projetos centrados nas DLS. Para além da investigação translacional, tem dado particular enfoque ao desenvolvimento de novos modelos *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos patológicos e testar terapias inovadoras. Embora os fibroblastos de doentes continuem a ser amplamente utilizados como modelo celular, permitindo o estudo da acumulação lisossomal e a avaliação de terapias, a sua limitação em replicar fenótipos de tecidos complexos, como o sistema nervoso central, tem motivado o desenvolvimento de abordagens mais avançadas. Nesse sentido, têm sido estabelecidos modelos neuronais a partir de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados (SHED, do inglês *Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth*) e de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced Pluripotent Stem Cells*) derivadas de fibroblastos de doentes, possibilitando o estudo direto dos efeitos das variantes patogénicas em tipos celulares mais relevantes. Paralelamente, estão a ser estabelecidos modelos animais de peixe-zebra com variantes específicas, gerados por CRISPR/Cas9. Estas ferramentas permitem avaliar a patogenicidade de variantes de significado incerto (VUS, do inglês *Variants of Uncertain Significance*) detetadas por NGS, estudar os mecanismos moleculares associados a cada doença e desenvolver terapias personalizadas, como as chamadas terapias *N-of-few*, direcionadas a variantes específicas.

## \_Objetivo e metodologia

Os principais objetivos deste artigo foram: (i) Divulgar a geração e caracterização de modelos *in vitro* de DLS, incluindo cinco modelos de SHEDs para MPS I, II, IIIB, IIIC e VI, e três modelos de iPSCs para MPS IIIC e IIID e ML II; (ii) Apresentar o desenvolvimento de modelos *in vivo* de peixe-zebra para MPS IIIB e ML II, obtidos por edição genética via CRISPR/Cas9 *knock-out* (KO) e *knock-in* (KI); (iii) Avaliar a relevância destes modelos para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos, validação de variantes genéticas e teste de novas estratégias terapêuticas. Para isso foi avaliado o fenótipo associado à respetiva doença lisossomal nestes modelos; (iv) Enquadrar o contributo destas metodologias para o avanço da medicina de precisão em doenças raras, com potencial impacto na melhoria dos cuidados de saúde prestados aos doentes em Portugal.

Todos os estudos aqui referidos foram conduzidos em conformidade com a Declaração de Helsínquia e aprovados pela Comissão de Ética do INSA [datas de aprovação: 28 de junho de 2020; 18 de maio de 2023 e 9 de outubro de 2023], bem como pela Comissão de Ética do *Cell Line and DNA Biobank from Patients Affected by Genetic Diseases do Istituto Giannina Gaslini* (quando aplicável).

Foi obtido consentimento informado por escrito dos indivíduos que forneceram as suas amostras para o estabelecimento de linhas celulares, e seu estudo subsequente.

## \_Resultados e discussão

A Unidade de Investigação e Desenvolvimento do DGH do INSA tem vindo a consolidar uma linha de investigação robusta e estratégica na área das DLS, centrada não só na caracterização bioquímica e genética dos doentes, mas também no desenvolvimento de modelos funcionais inovadores, com vista à validação de variantes genéticas e à exploração de novas abordagens terapêuticas.

O presente trabalho representa um avanço significativo neste contexto, ilustrando a geração de modelos celulares e animais específicos para várias DLS, nomeadamente MPS I, II, IIIB, IIIC, IIID e VI e ML II.

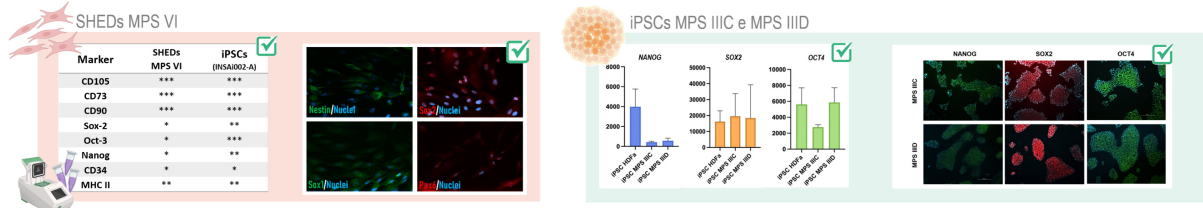
## Geração de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados (SHEDs)

Foram estabelecidas, pela primeira vez, linhas SHEDs de vários doentes com MPS, nomeadamente: I, II, IIIB, IIIC e VI. Para isso, as SHEDs foram estabelecidas a partir de fragmentos de polpa dentária isolados de dentes de doentes com estas patologias de acordo com (18). Em geral, estas células apresentaram morfologia típica de células estaminais mesenquimais (MSCs) e viabilidade adequada. Confirmou-se a expressão de marcadores de MSCs (CD105, CD73 e CD90) e a capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas reforçando o potencial inigualável destas células para modelar doenças neurodegenerativas. A caracterização destas células permitiu verificar a presença dos defeitos moleculares esperados bem como a ausência de atividade das enzimas em causa. Conseguimos também confirmar que apresentaram fenótipos típicos de doença lisossomal, como, por exemplo, acumulação significativa de glicosaminoglicanos (GAG), o que é indicativo de disfunção lisossomal. Poderão encontrar-se detalhes dos resultados observados para MPS II em (18), estando outros trabalhos em preparação (ver na figura 1 os resultados obtidos numa linha de MPS VI). Estes resultados são particularmente relevantes, pois demonstram que, apesar da sua elevada taxa de divisão celular e consequente nível de proliferação, estas células preservam o fenótipo de doença, o que as pode tornar adequadas para estudos iniciais de fisiopatologia e rastreio de terapias, dispensando, numa primeira fase, a diferenciação em tipos celulares específicos.

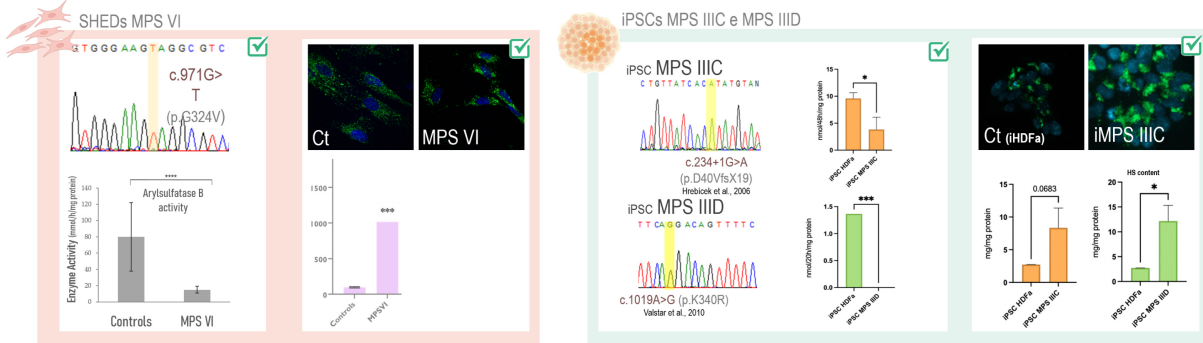
Figura 1: Representação esquemática das análises efetuadas *in vitro* para cada uma das linhas estaminais estabelecidas para MPS III e análise crítica comparativa dos métodos que nos permitiram estabelecê-las.

## Análise das linhas estabelecidas

### 1: Confirmação da estaminalidade através de diferentes métodos



### 2: Confirmação da presença de marcadores de doença lisossomal de sobrecarga/MPS por diferentes métodos



## Análise Crítica

### Estabelecimento de culturas SHED:

- ✗ Curta janela temporal para garantir o sucesso da técnica: só funciona quando os dentes decíduos chegam ao laboratório no máximo 48h pós-queda;
- ✗ Cultura primária propensa a contaminação
- ✓ Protocolo eficiente em termos de tempo e custo
- ✓ Não requer tantos controlos de qualidade/testes de segurança quanto as iPSCs, uma vez que são 'naturally-occurring stem cells'.

### Estabelecimento de culturas iPSC:

- ✗ Protocolo exigente em termos de tempo e custo
- ✗ Requer muitos/uma série de controlos de qualidade/testes de segurança, incluindo esterilidade, mycoplasma, análise da 'clearance' dos vectores usados para a reprogramação e análise de cariótipo
- ✓ Protocolo standardizado, bem validado, aceite internacionalmente por toda a comunidade científica
- ✓ Mais fácil de diferenciar em linhas celulares de interesse usando kits comerciais

A rosa estão representados os blocos relativos aos estudos em SHEDs, e a verde em iPSCs. Nesta ilustração, usámos apenas linhas MPS, por serem mais comparáveis entre si, e seleccionámos linhas cuja caracterização não foi ainda publicada a não ser no âmbito de teses. Para ilustrar os resultados obtidos em SHEDs, escolhemos apresentar imagens da linha MPS VI, enquanto que os resultados apresentados para iPSCs foram obtidos em linhas MPS IIIC e MPS IIID. 1) Confirmação da estaminalidade por vários métodos. Em ambos os casos, o fenótipo estaminal foi confirmado através da presença de marcadores standard de estaminalidade: NANOG, SOX2 e OCT3/4. A sua presença foi avaliada tanto quantitativa como qualitativamente, por RT-qPCR e imunofluorescência, respetivamente. No caso das SHEDs, avaliamos também um painel de outros marcadores de superfície, por RT-qPCR, para melhor validar o fenótipo de MSC. 2) Confirmação da presença de marcadores de doença lisossomal de sobrecarga/MPS. Para além da habitual confirmação da presença das variantes causais, e do seu defeito enzimático associado (défice em arilsulfatase B em SHEDs MPS VI, e em HGSNAT e GNS, em iPSCs MPS IIIC e IIID, respetivamente), confirmamos também, por LC-MS/MS, a presença de sulfato de heparano acumulado, e, por imunofluorescência, a alteração do padrão de distribuição da LAMP.

## Geração de iPSCs

As linhas de iPSCs de ML II, MPS IIIC e IIID foram geradas a partir de fibroblastos de doentes com estas patologias, obtidos a partir de um biobanco (Instituto Giannina Gaslini).

Foi utilizada uma abordagem não integrativa seguindo o *workflow* previamente estabelecido pela equipa para a geração das primeiras iPSCs no INSA (19,20). Após adquirirem morfologia típica de células estaminais embrionárias humanas, realizaram-se várias análises visando a sua caracterização, incluindo a ausência de vetores de reprogramação, expressão endógena de fatores de transcrição e marcadores de superfície de pluripotência, bem como a capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas. A caracterização genética validou a sua identidade por análise de *Short Tandem Repeats* (STR), estabilidade do cariótipo e presença da variante causadora da doença. Foi também excluída a contaminação por micoplasma. A nível bioquímico, para as linhas MPS IIIC e IIID confirmou-se a deficiência enzimática associada a cada uma das doenças, e avaliaram-se dois marcadores fenotípicos chave da MPS III, a acumulação de sulfato de heparano e o padrão de distribuição da LAMP, ambos alterados em comparação com os controlos, em concordância com o observado nas linhas parentais de fibroblastos (ver na [figura 1](#), MPS IIIC e IIID). Relativamente à ML II, foi gerada, pela primeira vez, uma linha de iPSCs para esta doença, a partir de fibroblastos de um doente homocigótico para a variante causal mais comum (c.3503\_3504del no gene *GNPTAB*). A linha de iPSCs ML II apresentou todas as características de pluripotência, tendo sido oficialmente registada no *Human pluripotent stem cell registry* como INSAi003-A, e com preservação do fenótipo da doença. Os resultados obtidos nesta linha, estão já publicados (21).

Apesar de ainda não terem sido diferenciadas em tipos celulares relevantes para as respetivas doenças (ex: condrócitos, neurónios ou cardiomiócitos), o seu valor como modelo *in vitro* para estudos fenotípicos é enorme dado o seu potencial para futuras aplicações em investigação e desenvolvimento pré-clínico de terapias dirigidas. Exemplos são os oligonucleótidos antissense, ou outras moléculas

de RNA com potencial terapêutico, aos quais a nossa unidade tem também dedicado muita atenção ao longo dos últimos anos (22-26). A geração destes modelos celulares reforça o compromisso do INSA com a criação de recursos reprodutíveis e partilháveis para a comunidade científica, com potencial para apoiar projetos de investigação colaborativos e desenvolvimento pré-clínico de terapias.

## Geração de modelos de peixe-zebra

Paralelamente, através da edição genética dirigida aos genes ortólogos *naglu* e *gnptab* por tecnologia CRISPR/Cas9, foram gerados modelos de peixe-zebra para a MPS IIIB e ML II, os quais apresentam impacto fenotípico mensurável, incluindo acumulação precoce de sulfato de heparano, alterações morfológicas e do comportamento locomotor.

Relativamente ao modelo de peixe-zebra para a MPS IIIB, a nível genético confirmou-se o KO do gene *naglu*, e a caracterização morfológica e bioquímica na fase de desenvolvimento embrionário revelou que este mimetiza o fenótipo observado nos doentes.

Quanto ao modelo de peixe-zebra para a ML II, foi introduzida a mutação ortóloga mais comum em humanos (c.3503\_3504delTC) com uma elevada taxa de KI (54%). No entanto, a maioria dos embriões apresentou mosaïcismo, sendo objetivo futuro otimizar a estratégia para gerar uma linha estável de fundadores heterocigóticos modelo para ML II.

## \_Conclusões

Os modelos experimentais desenvolvidos neste estudo, baseados em células do próprio doente ou em organismos geneticamente modificados, não apenas mimetizam aspetos fundamentais da patologia humana, como também constituem uma plataforma versátil para o teste de novas terapias e para a triagem de variantes genéticas. Este último ponto é particularmente relevante face a um dos principais desafios da medicina genómica atual, o aumento exponencial da deteção de VUS resultante da expansão das tecnologias de NGS. Estes modelos contribuem, assim, para colmatar esta limitação crítica e acelerar a translação dos resultados para a prática clínica.

Adicionalmente, o trabalho aqui descrito posiciona o INSA como uma referência nacional na aplicação de estratégias de medicina de precisão às doenças raras, alinhando-se com as orientações estratégicas do *European Joint Programme on Rare Diseases* (EJP RD) e da nova *European Rare Diseases Research Alliance* (ERDERA). A participação ativa nestas redes reforça o papel do INSA enquanto entidade de interface entre diagnóstico, investigação e políticas de saúde.

Em suma, os resultados obtidos demonstram que os modelos desenvolvidos (SHEDs, iPSCs e peixe-zebra) são ferramentas eficazes e complementares para o estudo das DLS. Estes modelos não só permitem aprofundar os mecanismos moleculares subjacentes à doença, como abrem caminho à identificação de alvos terapêuticos, ao rastreio de fármacos e ao desenvolvimento de terapias personalizadas, como as abordagens *N-of-few*. O trabalho realizado constitui, por isso, um contributo relevante para a investigação em doenças raras, com impacto potencial na melhoria dos cuidados de saúde prestados aos doentes em Portugal e além-fronteiras.

#### Financiamento:

Estes trabalhos foram financiados através de fundos nacionais e internacionais. A nível nacional destacamos três projetos FCT—Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. [EXPL/BTM-SAL/0659/2021 (<http://doi.org/10.54499/EXPL/BTM-SAL/0659/2021>); ASOS2cureMPSIII-2022.04667.PTDC (<https://doi.org/10.54499/2022.04667.PTDC>) e ModellingMLII-2022.03836.PTDC (<https://doi.org/10.54499/2022.03836.PTDC>)] bem como os fundos anualmente distribuídos pelo próprio INSA e o apoio da Unidade de I&D CECA (UIDB/00211/2020) e do LA à qual pertence, o AL4AnimalS (LA/P/0059/2020). A nível internacional, destacamos o apoio recebido pela Sanfilippo Children's Foundation (2019DGH1656/SCF2019I&D).

#### Referências bibliográficas:

- (1) Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, et al. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Oct 1;4(1):27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- (2) Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*. 2012 Nov 26;199(5):723-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208152>
- (3) Scerra G, De Pasquale V, Scarcella M, et al. Lysosomal positioning diseases: beyond substrate storage. *Open Biol*. 2022 Oct;12(10):220155. <https://doi.org/10.1098/rsob.220155>
- (4) Beck M. Variable clinical presentation in lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24(Suppl 2):47-51; discussion 45-6. <https://doi.org/10.1023/a:1012463605992>
- (5) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*. 2004 Feb;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (6) Coutinho MF, Encarnação M, Gomes R, et al. Origin and spread of a common deletion causing mucopolidiosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity. *Clin Genet*. 2011 Sep;80(3):273-80. Epub 2010 Sep 29. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01539.x>
- (7) Azevedo O, Gal A, Faria R, et al. Founder effect of Fabry disease due to p.F113L mutation: Clinical profile of a late-onset phenotype. *Mol Genet Metab*. 2020 Feb;129(2):150-160. Epub 2019 Jul 24. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.012>
- (8) Leal AF, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, et al. Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Jul;98(7):931-46. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01935-6>
- (9) Beck M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2018 Jan;60(1):13-18. Epub 2017 Nov 1. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13600>
- (10) Alves S, Mangas M, Prata MJ, et al. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis type II shows evidence that the IDS gene is prone to splicing mutations. *J Inherit Metab Dis*. 2006 Dec;29(6):743-54. Epub 2006 Oct 25. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0403-z>
- (11) Mangas M, Nogueira C, Prata MJ, et al. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type IIIB in Portugal: evidence of a single origin for a common mutation (R234C) in the Iberian Peninsula. *Clin Genet*. 2008 Mar;73(3):251-6. Epub 2008 Jan 23. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00951.x>
- (12) Encarnação M, Lacerda L, Costa R, et al. Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolidiosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet*. 2009 Jul;76(1):76-84. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01185.x>
- (13) Coutinho MF, Lacerda L, Pinto E, et al. Molecular and computational analyses of genes involved in mannose 6-phosphate independent trafficking. *Clin Genet*. 2015 Aug;88(2):190-4. Epub 2014 Sep 17. <https://doi.org/10.1111/cge.12469>
- (14) Coutinho MF, Encarnação M, Matos L, et al. Molecular Characterization of a Novel Splicing Mutation underlying Mucopolysaccharidosis (MPS) type VI-Indirect Proof of Principle on Its Pathogenicity. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Jan 21;10(2):58. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10020058>
- (15) Encarnação M, Coutinho MF, Silva L, et al. Assessing Lysosomal Disorders in the NGS Era: Identification of Novel Rare Variants. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 1;21(17):6355. <https://doi.org/10.3390/ijms21176355>
- (16) Encarnação M, Coutinho MF, Cho SM, et al. NPC1 silent variant induces skipping of exon 11 (p.V562V) and unfolded protein response was found in a specific Niemann-Pick type C patient. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Nov;8(11):e1451. Epub 2020 Sep 15. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1451>
- (17) Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Tratamento de doenças lisossomais de sobrecarga: relatório 2022. Porto: INSA, 2024. <http://hdl.handle.net/10400.18/9212>
- (18) Carvalho S, Santos JI, Moreira L, et al. Modeling Lysosomal Storage Disorders in an Innovative Way: Establishment and Characterization of Stem Cell Lines from Human Exfoliated Deciduous Teeth of Mucopolysaccharidosis Type II Patients. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 21;25(6):3546. <https://doi.org/10.3390/ijms25063546>

artigos breves\_ n. 11

- (19) Duarte AJ, Ribeiro D, Santos R, et al. Induced pluripotent stem cell line (INSAi001-A) from a Gaucher disease type 3 patient compound heterozygote for mutations in the GBA1 gene. *Stem Cell Res.* 2019 Dec;41:101595. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101595>
- (20) Duarte AJ, Ribeiro D, Santos R, et al. Induced pluripotent stem cell line (INSAi002-A) from a Fabry Disease patient hemizygote for the rare p.W287X mutation. *Stem Cell Res.* 2020 May;45:101794. Epub 2020 Apr 20. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101794>
- (21) Moutinho ME, Gonçalves M, Duarte AJ, et al. Establishment of a Human iPSC Line from Mucopolipidosis Type II That Expresses the Key Markers of the Disease. *Int J Mol Sci.* 2025 Apr 19;26(8):3871. <https://doi.org/10.3390/ijms26083871>
- (22) Matos L, Canals I, Dridi L, et al. Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Dec 10;9:180. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0180-y>
- (23) Matos L, Gonçalves V, Pinto E, et al. Functional analysis of splicing mutations in the IDS gene and the use of antisense oligonucleotides to exploit an alternative therapy for MPS II. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Dec;1852(12):2712-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.011>
- (24) Matos L, Duarte AJ, Ribeiro D, et al. Correction of a Splicing Mutation Affecting an Unverricht-Lundborg Disease Patient by Antisense Therapy. *Genes (Basel).* 2018 Sep 11;9(9):455. <https://doi.org/10.3390/genes9090455>
- (25) Matos L, Vilela R, Rocha M, et al. Development of an Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping Therapeutic Strategy for Mucopolipidosis II: Validation at RNA Level. *Hum Gene Ther.* 2020 Jul;31(13-14):775-783. Epub 2020 May 20. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.034>
- (26) Santos JI, Gonçalves M, Almeida MB, et al. mRNA Degradation as a Therapeutic Solution for Mucopolysaccharidosis Type IIIC: Use of Antisense Oligonucleotides to Promote Downregulation of Heparan Sulfate Synthesis. *Int J Mol Sci.* 2025 Feb 1;26(3):1273. <https://doi.org/10.3390/ijms26031273>