

# POSSÍVEL PAPEL DA DELEÇÃO 20q11.21-13.32 EM IMPEDIR A GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDAS (IPSC)

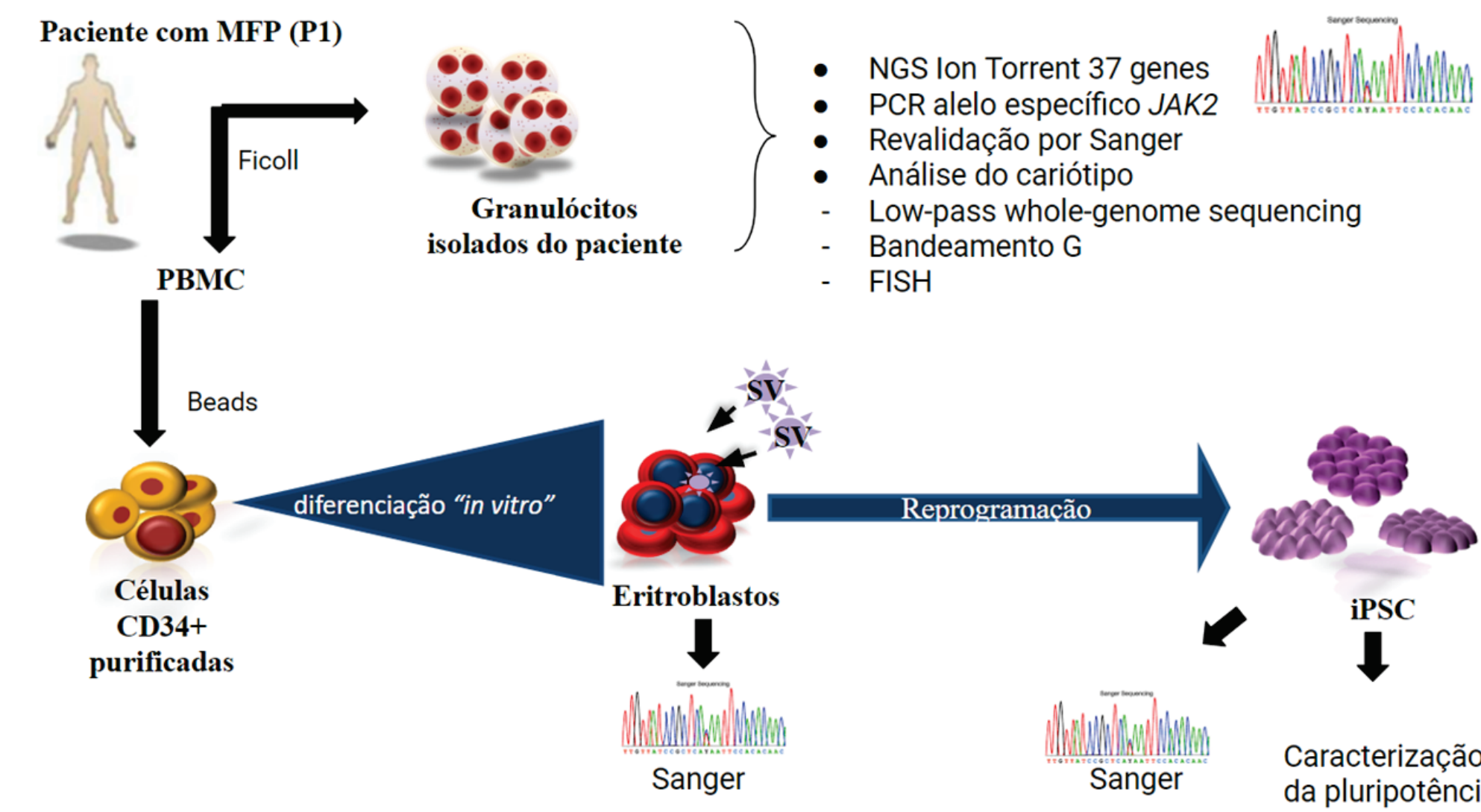
Gomez CE<sup>1</sup>, P MA<sup>1</sup>, Vieira RR<sup>2</sup>, Padilha T<sup>2</sup>, Moshemar M<sup>2</sup>, Zalberg I<sup>2</sup>, Dumas GAH<sup>3</sup>, Souza C<sup>4</sup>, Rehen S<sup>5,6</sup>, Bonamino, MH<sup>1,7</sup>, Reis BC<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto nacional de câncer, <sup>2</sup>Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) - Instituto Nacional de Câncer, <sup>3</sup>Serviço de Hematologia, Hospital Universitário Antonio, UFF, <sup>4</sup>Hemon Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, <sup>5</sup>D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rua Diniz Cordeiro 30, Rio de Janeiro, 222281-100, Brazil, <sup>6</sup>Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Avenida Carlos Chagas 373, Rio de Janeiro 21941-590, Brazil, <sup>7</sup>FIOCRUZ- Oswaldo Cruz Foundation Institute, Avenida Brasil 4365 -Manguinhos, Rio de Janeiro. 21040-360, Brazil

## INTRODUÇÃO

Pacientes com mielofibrose primária (MFP) apresentam mutações driver em JAK2, CALR ou MPL e mutações adicionais foram identificadas em genes reguladores epigenéticos, assim como anormalidades cromossômicas, sendo frequentes as deleções em 13q, 17q e 20q. Deleções no 20q impactam no prognóstico da MFP. As células tronco de pluripotência induzida (iPSC) de pacientes representam uma plataforma interessante para o estudo *in vitro* do papel de alterações genômicas. Neste trabalho buscamos gerar iPSC a partir de células tronco/progenitoras hematopoéticas (HSC) de um paciente com MFP portador de mutação JAK2 V617F, ASXL1 Y591\*fs1 e deleção no cromossomo 20q.

## MATERIAL E MÉTODOS



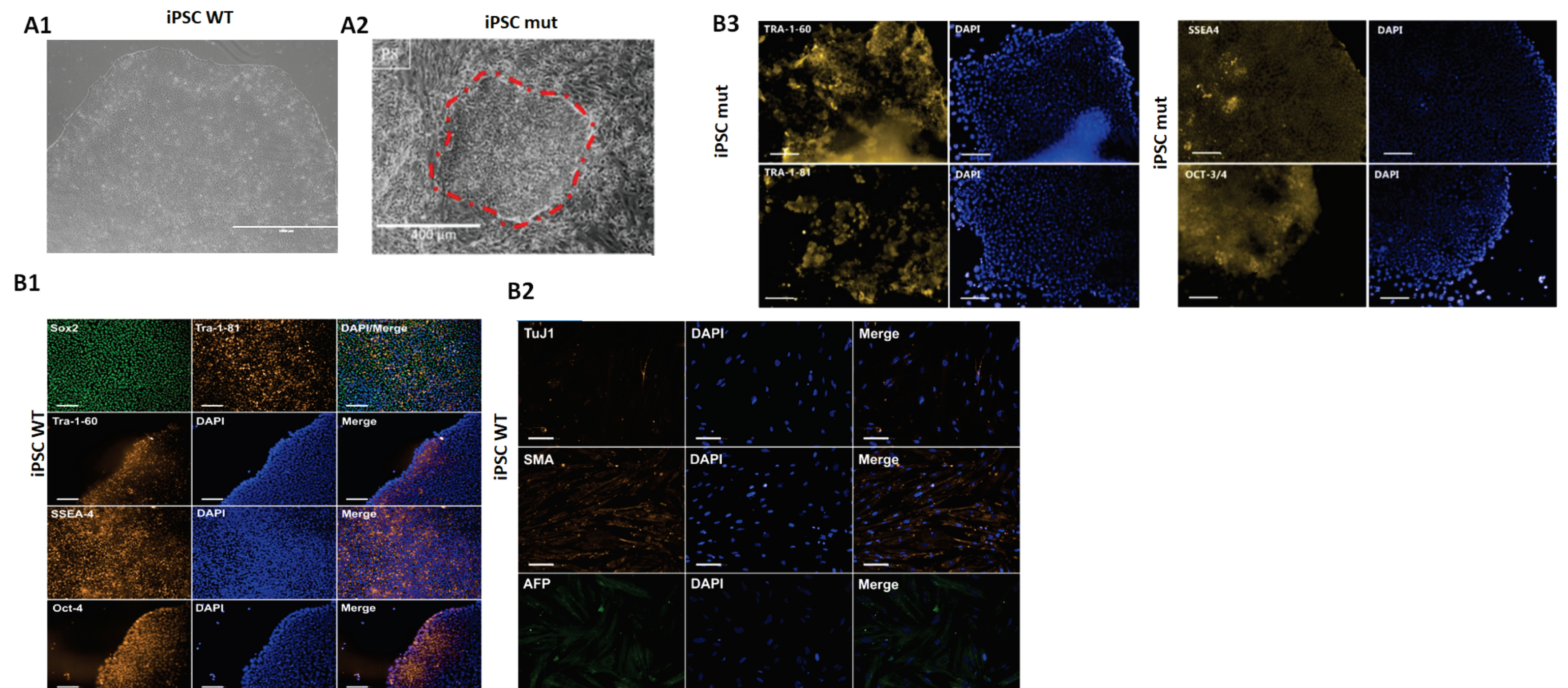
**Fig. 1. Esquema experimental.** A caracterização molecular das células primárias foram realizadas por NGS e revalidadas por Sanger. As iPSCs foram caracterizadas por Sanger. Além disso, a análise do cariótipo e identificação de deleções no cromossomo 20 de ambos os tipos de células foram realizados mediante a técnica GTG (Padrão de banda G-TripsinaGiemsa) assim como Híbridação fluorescente *in situ* (FISH).

## RESULTADOS

**Tabela 1. Caracterização molecular dos granulócitos isolados do paciente P1 e das iPSC derivadas das células Cd34+.** O DNA extraído dos Granulócitos isolados do paciente foi analisado por NGS. As mutações identificadas nos genes JAK2 e ASXL1 foram revalidadas por Sanger.

Tipo de célula	Fenótipo	Mutação Driver	Mutação adicional	Cariótipo
Granulócito primário	PMF	JAK2 V617F	ASXL1 Y591fs*1	deleção 20q11.21-q13.32
17 iPSC	PMF	JAK2WT	ASXL1 WT	normal
2 iPSC	PMF	JAK2 V617F	ASXL1 Y591fs*1	deleção 20q11.21-q13.32

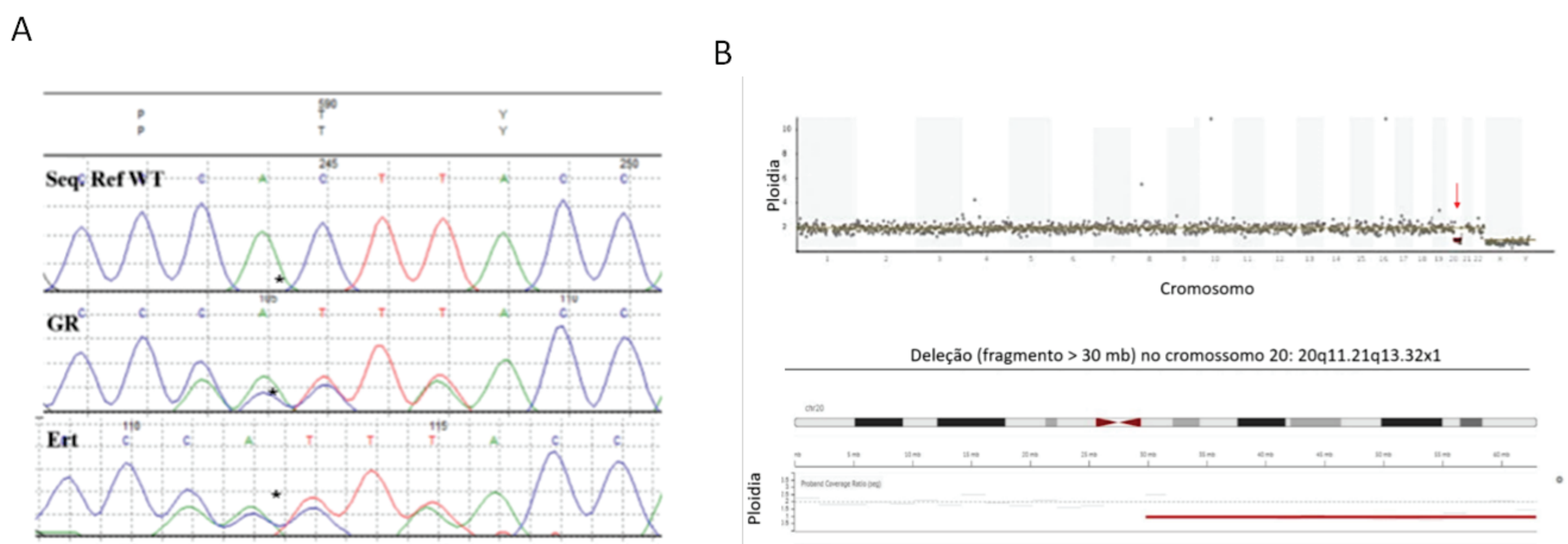
### Caracterização da pluripotência das iPSCs geradas a partir da amostra isoladas do P1



### Identificação de genes associados a pluripotência na região correspondente ao fragmento deletado (análise *in silico*)

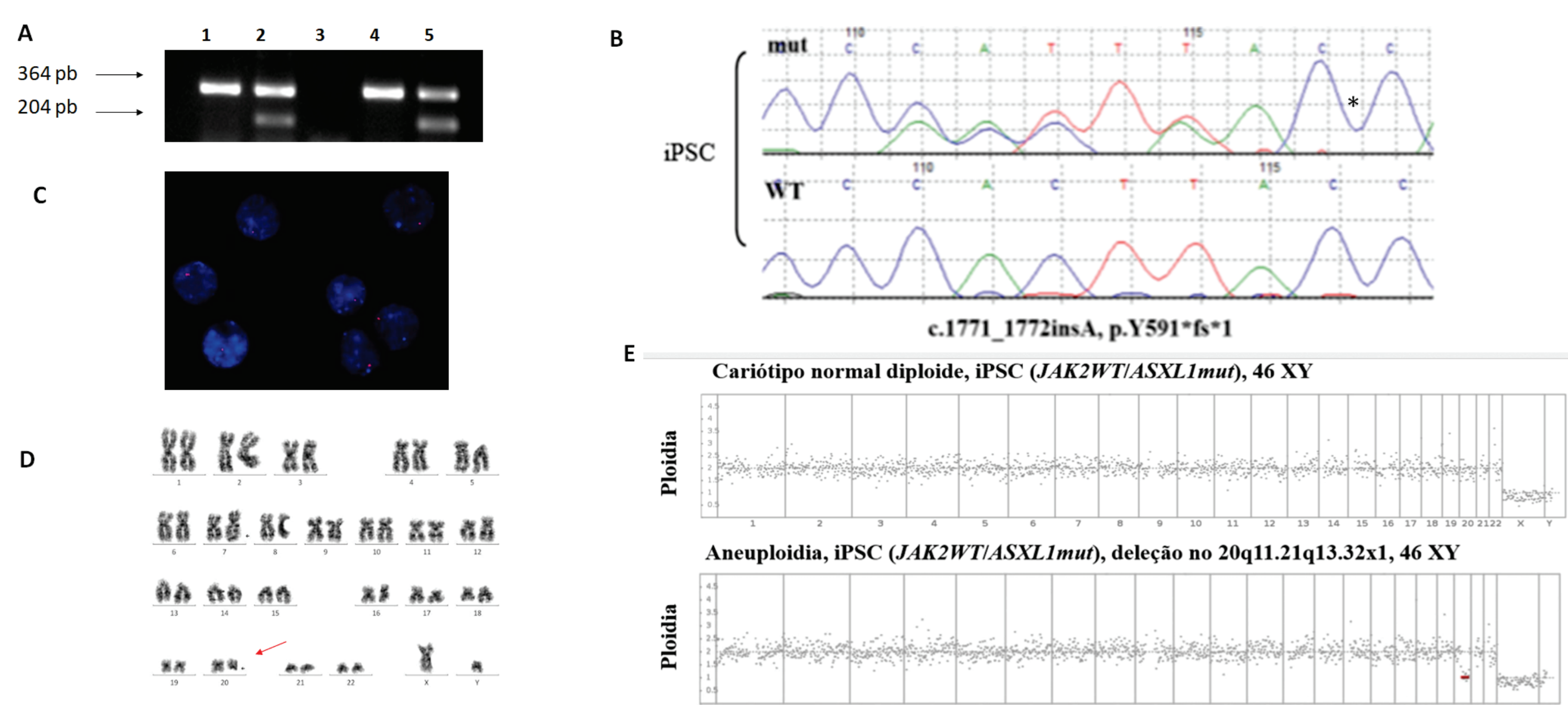
**Fig. 4. A. Caracterização da pluripotência das colônias iPSCs derivadas do P1.** A1, A2. Imagens da morfologia da iPSCs portadora das mutações JAK2V616 e ASXL1 mut e uma iPSC WT para ambos os genes, respectivamente. Barra: 400. B1, B3. Caracterização de pluripotência de um clone iPSC WT para ambos os genes e uma iPSC mut (JAK2V617F/ASXL1Y591fs\*1) derivada do P1, foram detectados por imunofluorescência os marcadores de pluripotência SSEA-4, OCT-3/4, TRA-1-60 e TRA-1-81 (vermelho), respectivamente. O núcleo foi marcado com DAPI (azul), barra: 100 µm. B2. detecção dos marcadores específicos para ectoderma: Tubulina-βIII (vermelho), mesoderma: SMA, Endoderma: AFP (verde) foi realizada por imunofluorescência. DAPI (azul) Magnificação 20X. Barra de referência 100 µm. todas as imagens foram adquiridas usando o microscópio invertido Evox XL Cell Imaging System.

### Caracterização Molecular dos Granulócitos

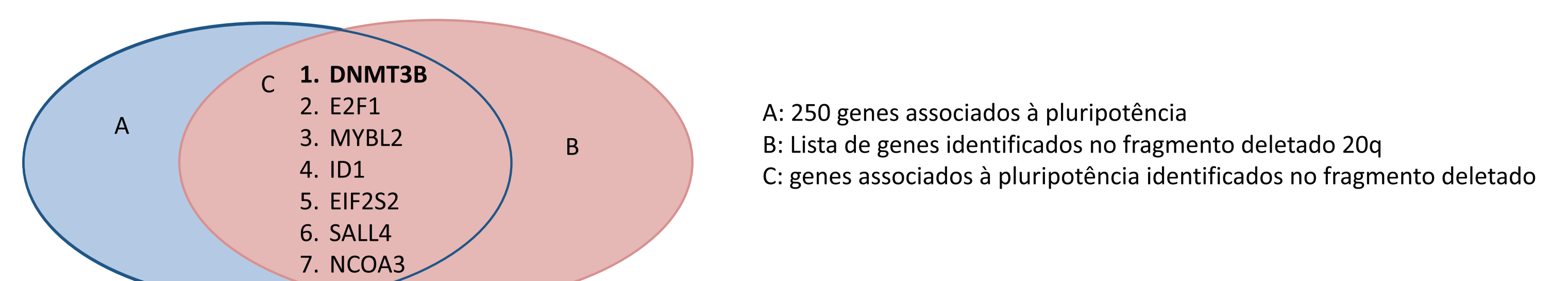


**Fig. 2. A. Sequenciamento do gene ASXL1 dos Granulócitos e dos eritroblastos diferenciados "in vitro" a partir da CD34+.** B. Análise de aneuploidia dos granulócitos do paciente por Low-Pass whole-genome sequencing. Imagem da análise do número de cópias (CNV) de cada cromossomo avaliado usando o low-pass whole genome sequencing Snapshot of IGV Lighth Whole Genome.

### Caracterização molecular das iPSCs geradas a partir da amostra isoladas do P1



**Fig. 3. A. Caracterização molecular das iPSC geradas a partir das amostras do P1.** A PCR alelo específico para identificação do alelo mutado JAK2V617F (204 pb). A banda de 364 pb corresponde ao controle interno (CI) 1: Imagem representativa das iPSCs JAK2 WT, 2: imagem representativa das iPSCs JAK2 V617F. 3. controle negativo da reação de PCR. 4. Amostra de um doador saudável JAK2 WT usada como controle negativo. 5. Amostra de um paciente JAK2V617 usada como controle positivo. B. Sequenciamento do gene ASXL1 das iPSC derivadas do P1. C. Identificação da deleção 20q da iPSC JAK2V617F e ASXL1 mut realizado por FISH. Imagem ilustrativa da identificação da deleção nas células iPSCs clone mutado. D. Cariótipo do iPSC da iPSC JAK2V617F e ASXL1 mut. E. Análise de aneuploidia das iPSCs por Low-Pass whole-genome sequencing.



## DISCUSSÃO

Nestes últimos anos evidências têm mostrado que alterações no cromossomo 20q poderiam estar impactando no estado de pluripotência das células iPSC, porém ainda pouco se sabe sobre seu papel na reprogramação celular. Trabalhos recentes têm mostrado que a duplicação do 20q poderia participar tanto na pluripotência quanto na resistência à apoptose das células ES.

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a mutação no gene ASXL1Y591fs\*1 e/ou a deleção no cromossomo 20q poderiam ter um impacto negativo na reprogramação celular, bem como no estado de pluripotência alcançado pela linhagem.