



ROSANA ANTUNES DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE  
TIROSINOQUINASES EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELOIDE CRÔNICA PELA PESQUISA DE MUTAÇÕES DO GENE  
*BCR-ABL* E ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE  
PACIENTES TRATADOS COM IMATINIBE E DASATINIBE**

CAMPINAS

2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ROSANA ANTUNES DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE  
TIROSINOQUINASES EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELOIDE CRÔNICA PELA PESQUISA DE MUTAÇÕES DO GENE  
*BCR-ABL* E ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE  
PACIENTES TRATADOS COM IMATINIBE E DASATINIBE**

**Orientadora: Dra. Katia Borgia Barbosa Pagnano**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ROSANA ANTUNES DA  
SILVEIRA E ORIENTADA PELA DRA. KATIA BORGIA  
BARBOSA PAGNANO.

Assinatura da Orientadora

-----

Campinas

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Si39a Silveira, Rosana Antunes da, 1975-  
Avaliação da resistência aos inibidores de  
tirosinoquinases em pacientes com leucemia mieloide  
crônica pela pesquisa de mutações do gene BCR-ABL e  
análise do perfil de expressão gênica de pacientes  
tratados com imatinibe e dasatinibe / Rosana Antunes da  
Silveira. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Katia Borgia Barbosa Pagnano.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. Resistência a  
medicamentos. 3. Imatinibe. 4. Dasatinibe. 5. Expressão  
gênica. I. Pagnano, Katia Borgia Barbosa. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of resistance to tyrosine kinase inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia patients by BCR-ABL mutation analysis and gene expression profiling analysis of patients treated with imatinib mesylate and dasatinib.

**Palavras-chave em inglês:**

Chronic myeloid leukemia

Drug resistance

Imatinib

Dasatinib

Gene expression

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Doutora em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Katia Borgia Barbosa Pagnano [Orientador]

Fabiola Traina

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Paula de Oliveira Montandon Hokama

Anderson Ferreira da Cunha

**Data da defesa:** 03-05-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ROSANA ANTUNES DA SILVEIRA

---

---

Orientadora PROFA. DRA. KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO

---

## MEMBROS:

---

1. PROFA. DRA. KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO Katia B. Barbosa Pagnano

2. PROFA. DRA. FABIOLA TRAINA

Fabiola Traina

3. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

N. C.

4. PROFA. DRA. PAULA DE OLIVEIRA MONTANDON HOKAMA

Paula de O. M. Hokama

5. PROF. DR. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA

A. F. da Cunha

---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 03 de maio de 2013



## AGRADECIMENTOS

---

*À Dra. Katia Borgia Barbosa Pagnano por inicialmente ter me confiado este trabalho, pela sua constante motivação ao longo dele e pela generosidade e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.*

*Ao Dr. Fernando F. Costa por ter me recebido na Unicamp e pelo uso dos equipamentos do seu laboratório.*

*Ao Dr. Sergio Verjovski-Almeida, chefe do laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos, IQ, USP, pelo apoio imprescindível no desenvolvimento de grande parte deste trabalho.*

*À Ângela Aguirres Fachel, do laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos, IQ, USP, pela dedicação incansável em todas as etapas referentes aos experimentos com microarranjos, do desenho experimental às inúmeras análises, sempre precisa e atenta aos detalhes.*

*Ao Yuri J. C. B. Moreira, do laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos, IQ, USP, pelas contribuições também dadas aos experimentos com microarranjos e análise dos dados; suas ideias muito acrescentaram na realização deste trabalho.*

*Ao então aluno de Doutorado Ramon O. Vidal do Laboratório de Genômica e Expressão, do Instituto de Biologia da Unicamp, pelas análises de bioinformática referentes ao estudo das mutações.*

*À Eliana Miranda pelas análises estatísticas do estudo das mutações.*

*Ao Jerry Radich e sua equipe pela minha recepção no Fred Hutchinson Cancer Research Center em Seattle/EUA, pela disponibilidade em ajudar e ensinar.*

*A todos os funcionários dos laboratórios de Biologia Molecular, Hemoglobina e Genoma e Citogenética do Hemocentro da Unicamp, pela importante ajuda; em especial agradeço à Dulcinéia, Ângela, Anderson e Ucha pelo auxílio durante as diversas dificuldades laboratoriais surgidas durante este trabalho.*



*A todos os alunos pós-graduandos, graduandos e estagiários, pela convivência e troca de ideias.*

*Às amigas, Flávia Matoso, Simone Sant'anna e Daiane Almeida do Laboratório de Onco-Hematologia, por terem me socorrido muitas vezes e pela amizade.*

*Aos meus pais Augusto e Angelina, pelo amor, pela atenção, dedicação e compreensão em todas as etapas desta conquista.*

*A toda minha família pelo carinho, incentivo e palavras de apoio; vocês são e sempre serão muito importantes para mim.*

*À FAPESP pelo apoio financeiro.*



**A realização deste estudo contou com o apoio financeiro da  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Bolsa de Doutorado: processo no. 2005/59708-6

Auxílio pesquisa: processo no. 2005/60266-8



## Sumário

---

AGRADECIMENTOS .....	vii
SUMÁRIO .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS .....	xxi
LISTA DE FIGURAS .....	xxv
RESUMO .....	xxix
ABSTRACT .....	xxxiii
INTRODUÇÃO.....	37
1. Mecanismos de resistência aos inibidores de tirosinoquinases no tratamento da leucemia mielóide crônica.....	39
2. Análises de expressão gênica em LMC pela tecnologia de microarranjos .....	53
3. RNAs não codificadores.....	55
OBJETIVOS.....	61
Objetivo Geral.....	63
Objetivos Específicos .....	63
PACIENTES E MÉTODOS.....	65
1.1. Pesquisa de mutações no domínio quinásico do gene BCR-ABL em pacientes resistentes ao tratamento com TKIs.....	67
1.1. Pacientes.....	67
1.2. Critérios de classificação.....	67
1.3. Coleta das amostras e lise das hemácias .....	68
1.4. Extração de RNA .....	68
1.5. Síntese de cDNA .....	69
1.6. PCR semi-nested para amplificação do domínio quinásico BCR-ABL.....	70
1.7. Purificação dos produtos de PCR .....	71
1.8. Quantificação das amostras para sequenciamento direto.....	71
1.9. Reação de sequenciamento.....	72
1.10. Precipitação dos produtos amplificados e sequenciamento direto automatizado.....	74
1.11. Análise das sequências .....	74
1.12. Análise Estatística .....	75
2. Análise da expressão gênica de pacientes responsivos e não responsivos tratados com dasatinibe e IM .....	77
2.1. Amostras de pacientes .....	77
2.2. Separação das células mononucleares .....	78
2.3. Extração de RNA .....	78
2.4. Quantificação do RNA .....	78
2.5. Análise da integridade do RNA.....	79
2.6. Purificação do RNA .....	79
2.7. Síntese de cDNA, amplificação e marcação a partir de RNA total.....	80
2.8. Hibridização .....	82
2.9. Análise dos Dados e Normalização .....	84
2.10. Análise de significância estatística .....	85
RESULTADOS .....	87
1. Pesquisa de mutações no domínio quinásico do gene BCR-ABL em pacientes resistentes ao tratamento com TKIs .....	87



1.1. Pacientes.....	87
1.2. Pesquisa de mutações no domínio quinásico BCR-ABL.....	87
1.2.1. A partir da data de coleta da pesquisa de mutações.....	93
1.2.1.1. Características dos pacientes versus presença de mutações.....	98
1.2.1.2. Análises de sobrevida.....	99
1.2.2. Durante o tratamento com IM.....	106
2. Análise da expressão gênica de pacientes responsivos e não responsivos tratados com dasatinibe.....	108
2.1. Amostras de pacientes.....	108
2.2. Obtenção de RNA total para os experimentos de hibridização.....	110
2.3. Análises dos dados de expressão.....	112
2.3.1. Subgrupo 1 - Pré-tratamento responsivos <i>versus</i> pré-tratamento de não responsivos.....	112
2.3.2. Subgrupo 2 - Pré-tratamento responsivos <i>versus</i> pós-tratamento de não responsivos.....	116
2.3.3. Subgrupo 3 - Pacientes pré-tratamento não responsivos <i>versus</i> pós-tratamento de não responsivos.....	127
2.3.4. Comparações entre os subgrupos de amostras.....	138
3. Análise da expressão gênica de pacientes responsivos e não responsivos tratados com IM.....	140
3.1. Amostras de pacientes.....	140
3.2. Obtenção de RNA total para os experimentos de hibridização.....	142
3.3. Análises dos dados de expressão.....	144
3.3.1. Subgrupo 1 - Pré-tratamento responsivos <i>versus</i> pré-tratamento de não responsivos.....	144
3.3.2. Subgrupo 2 - Pré-tratamento responsivos <i>versus</i> pós-tratamento de não responsivos.....	153
3.3.3. Subgrupo 3 - Pacientes pré-tratamento não responsivos <i>versus</i> pós-tratamento de não responsivos.....	167
DISCUSSÃO.....	169
CONCLUSÕES.....	187
REFERÊNCIAS.....	193
ANEXOS.....	207
Anexo 1.....	209
Anexo 2.....	211
APÊNDICES.....	215
Apêndice 1.....	217
Apêndice 2 -12 (CD-ROM).....	247



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

aloTCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas Alogênico
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CB	Crise Blástica
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DQ	Domínio quinásico
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FA	Fase Acelerada
FC	Fase Crônica
FCP	Fase Crônica Precoce
FCT	Fase Crônica Tardia
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
HU	Hidroxiuréia
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
IM	Mesilato de imatinibe
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
lncRNA	RNA não codificador de proteína longo



LOOCV	<i>Leave-One-Out-Cross-Validation</i>
miRNA	microRNA
ncRNA	RNA não codificador de proteína
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	cromossomo <i>Philadelphia</i>
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
PIN	Parcialmente intrônico
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RCC	Resposta Citogenética Completa
RCM	Resposta Citogenética Maior
RCMe	Resposta Citogenética Menor
RCP	Resposta Citogenética Parcial
RHC	Resposta Hematológica Completa
RMM	Resposta Molecular Maior
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
siRNA	RNA curto de interferência
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Evento
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
TIN	Totalmente intrônico
TKI	Inibidor de tirosinoquinase
UTR	Região não traduzida



## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b>	Definição e avaliação da resposta de pacientes com LMC-FCP ao tratamento de primeira linha com IM segundo as recomendações da LeukemiaNet (2009) .....	44
<b>Tabela 2</b>	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo de avaliação de mutações no gene BCR-ABL.....	73
<b>Tabela 3</b>	Dados clínicos dos pacientes submetidos à análise de mutações de ponto no domínio quinásico BCR-ABL durante o uso .....	90
<b>Tabela 4</b>	Dados clínicos dos pacientes submetidos à análise de mutações de ponto no domínio quinásico BCR-ABL durante o uso de dasatinibe .....	92
<b>Tabela 5</b>	Dados clínicos e hematológicos dos sete pacientes com LMC tratados com dasatinibe.....	109
<b>Tabela 6</b>	Lista dos cinco genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe.....	115
<b>Tabela 7</b>	Lista dos dois lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe .....	116
<b>Tabela 8</b>	As cinco funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe .....	119
<b>Tabela 9</b>	As cinco redes gênicas mais significativamente enriquecidas para genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe.....	121
<b>Tabela 10</b>	Três funções biológicas significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína de mesmo loci dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe .....	124
<b>Tabela 11</b>	Seis redes gênicas significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína de mesmo loci dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe. ....	125
<b>Tabela 12</b>	As cinco funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes diferencialmente expressos entre as amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe .....	130



<b>Tabela 13</b>	Vias canônicas significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe.....	132
<b>Tabela 14</b>	As cinco redes mais significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe .....	133
<b>Tabela 15</b>	Quatro redes gênicas significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína de mesmo loci genômico dos lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe .....	136
<b>Tabela 16</b>	Dados clínicos dos pacientes tratados com MI e analisados pela técnica de microarranjos.....	141
<b>Tabela 17</b>	Lista dos 53 genes diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de responsivos e não responsivos ao IM .....	147
<b>Tabela 18</b>	Lista dos 19 lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de responsivos e não responsivos ao IM .....	151
<b>Tabela 19</b>	As duas redes gênicas mais significativamente enriquecidas com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de resistentes ao IM .....	156
<b>Tabela 20</b>	As três funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína de mesmo loci dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM .....	162
<b>Tabela 21</b>	As duas redes gênicas mais significativamente enriquecidas com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de resistentes ao MI .....	163
<b>Tabela 22</b>	Padrões de expressão de lncRNAs e de genes codificadores de mesmo loci gênico em amostras pós-tratamento de pacientes não responsivos em relação a amostras pré-tratamento de pacientes responsivos ao IM.....	165



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Processo de formação do oncogene BCR-ABL e as vias de sinalização alteradas em função da sua atividade proteica desregulada .....	40
<b>Figura 2</b>	Estrutura tridimensional da quinase ABL ligada ao IM .....	46
<b>Figura 3</b>	Ilustração esquemática das orientações dos elementos presentes no oligorray desenhado por Nakaya et al. (2007).....	59
<b>Figura 4</b>	Esquema do processo de geração de cRNA para um experimento com microarranjos utilizando o sistema “duas cores” (Agilent Technologies) .....	81
<b>Figura 5</b>	As duas mutações no domínio quinásico BCR-ABL mais frequentes encontradas em pacientes resistentes ao tratamento com IM neste estudo .....	96
<b>Figura 6</b>	Análises de sobrevida de pacientes com mutação versus pacientes sem mutação .....	101
<b>Figura 7</b>	Análises de sobrevida a partir do status mutacional.....	103
<b>Figura 8</b>	Análises de sobrevida de pacientes com mutação de acordo com o uso de TKI de segunda geração .....	105
<b>Figura 9</b>	Análises de sobrevida durante o uso de IM ( $p < 0,05$ ).....	107
<b>Figura 10</b>	Eletroferograma de RNA total extraído de células mononucleares de sangue periférico de um paciente tratado com dasatinibe antes e após o processo de purificação.....	111
<b>Figura 11</b>	Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com dasatinibe.....	114
<b>Figura 12</b>	Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao dasatinibe .....	117
<b>Figura 13</b>	Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC não responsivos pré e pós-tratamento com dasatinibe.....	128
<b>Figura 14</b>	Vias canônicas identificadas pelo programa Ingenuity Pathway Analysis como significativamente enriquecidas com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe .....	131



<b>Figura 15</b>	Diagrama de Venn com os transcritos diferencialmente expressos identificados pelas três diferentes comparações das amostras dos pacientes com LMC .....	139
<b>Figura 16</b>	Eletroferograma de RNA total extraído de células mononucleares de sangue periférico de um paciente tratado com IM antes e após o processo de purificação.....	143
<b>Figura 17</b>	Perfil de expressão de genes codificadores em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com IM .....	146
<b>Figura 18</b>	Perfil de expressão de lncRNAs em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com IM.....	150
<b>Figura 19</b>	Perfil de expressão de genes codificadores em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao IM.....	154
<b>Figura 20</b>	Rede gênica mais enriquecida com genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao IM .....	157
<b>Figura 21</b>	Segunda rede gênica mais enriquecida com genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao IM.....	158
<b>Figura 22</b>	Vias canônicas identificadas pelo programa Ingenuity Pathway Analysis como significativamente enriquecidas com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao IM .....	159
<b>Figura 23</b>	Perfil de expressão de lncRNAs em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao IM.....	161



## RESUMO

---

O uso de inibidores de tirosinoquinases (TKIs) tem demonstrado eficácia no tratamento da Leucemia Mieloide Crônica (LMC). Porém, o fenômeno da resistência é um importante problema na prática clínica e ainda não está completamente elucidado. Além da presença de mutações no domínio quinásico (DQ) do gene *BCR-ABL*, diversos mecanismos moleculares foram relacionados à resistência aos TKIs. Adicionalmente, alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar assinaturas de expressão gênica associadas à resistência citogenética primária ao imatinibe (IM). Até o momento, a expressão de transcritos sem potencial codificador, mais especificamente de RNAs não codificadores longos (lncRNAs), ainda não foi investigada neste aspecto. lncRNAs, transcritos especialmente de regiões intrônicas, têm sido apontados recentemente como possíveis reguladores da expressão gênica em células normais e cancerosas. O objetivo geral deste estudo foi avaliar possíveis mecanismos de resistência ao tratamento com TKIs em pacientes com LMC, através da pesquisa de mutações no DQ do gene *BCR-ABL* e da identificação de genes codificadores e lncRNAs intrônicos diferencialmente expressos entre pacientes responsivos (R) e não responsivos (NR) ao IM e dasatinibe. A pesquisa de mutações realizada pela técnica de sequenciamento direto revelou que 37% (26/71) dos pacientes avaliados apresentavam mutações, sendo as mais frequentes T315I (25%), M244V (18%) e E255K/V (14%). As taxas de Sobrevida Global (SG) ( $p = 0,008$ ), Sobrevida Livre de Progressão ( $p = 0,03$ ) e Sobrevida Livre de Evento (SLE) ( $p = 0,006$ ) foram menores para os pacientes com mutações. SG ( $p = 0,04$ ) e SLE ( $p = 0,03$ ) foram significativamente menores para os pacientes com a mutação T315I. A identificação de



perfis de expressão gênica por microarranjos foi realizada a partir de amostras de células mononucleares de sangue periférico de 7 e 21 pacientes, respectivamente, para os estudos envolvendo dasatinibe e IM. Duas plataformas de microarranjos (Agilent Technologies) foram utilizadas neste estudo; a primeira com sondas que mapeiam exclusivamente em genes codificadores de proteína e a segunda, customizada, com 44.000 elementos que mapeiam em regiões intrônicas e exônicas de mesmo locus. As análises estatísticas foram realizadas com as técnicas *Significance Analysis of Microarrays* e *patient leave-one-out cross-validation*. Genes codificadores de proteína e lncRNAs diferencialmente expressos foram identificados a partir de comparações de três subgrupos de amostras de R e NR, pré e pós-tratamento. Em seguida, cada conjunto de transcritos diferencialmente expressos foi analisado através do programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) para a identificação de funções biológicas, redes gênicas e vias canônicas significativamente enriquecidas. Entre os transcritos encontrados como diferencialmente expressos entre R e NR estão *ABCF2*, *PAWR*, *ncCD44*, *ncTNFAIP8* e *ncFOXO3A* no estudo com dasatinibe e *LEF1*, *BCL2*, *FYN*, *ncPXN*, *ncNCAM1* e *ncRASEF* no estudo com IM. Porém, no estudo com IM, os conjuntos de transcritos diferencialmente expressos não distinguiram totalmente os casos R e NR. O presente trabalho identificou transcritos diferencialmente expressos entre amostras de pacientes R e NR tratados com dasatinibe e MI e sugere que lncRNAs possuem um importante papel nos mecanismos moleculares de resistência. Futuras investigações serão necessárias para a confirmação destes achados.



## ABSTRACT

---

The use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has demonstrated efficacy in treating chronic myeloid leukemia (CML). However, resistance is an important problem in clinical practice and it has not yet been completely elucidated. Besides mutations within the BCR/ABL kinase domain (KD), diverse molecular mechanisms have been proposed to account for resistance to TKIs. Furthermore, some studies have been performed in order to identify gene expression signatures associated with primary cytogenetic resistance to imatinib (IM). So far, non-protein-coding RNAs expression, more specifically long non-coding RNAs (lncRNAs) expression, has not been investigated in this aspect. LncRNAs, especially those transcribed from intronic regions, have recently been suggested as potential regulators of gene expression in normal and cancer cells. The aim of this study was to evaluate possible mechanisms of resistance to TKI treatment in CML patients by performing *BCR-ABL* mutation analysis and identifying differentially expressed protein-coding genes and intronic lncRNAs in responder (R) and non-responders (NR) patients to IM and dasatinib. Mutation analysis performed by direct sequencing identified mutations in 37% (26/71) of the analyzed patients; the three most frequently detected mutations were T315I (25%), M244V (18%) and E255K/V (14%). Overall survival (OS) ( $p = 0.008$ ), progression-free survival ( $p = 0.03$ ) and event-free survival (EFS) ( $p = 0.006$ ) rates were worse for patients harboring mutations. OS ( $p = 0.04$ ) and EFS ( $p = 0.03$ ) were significantly worse for T315I patients. Microarray expression profiling was performed on peripheral blood mononuclear cells from 7 and 21 patients, respectively, for the dasatinib and IM studies. Two array



platforms (Agilent Technologies) were used in this study: the first one with probes exclusively mapping to protein-coding genes; the second, a custom-designed 44K oligoarray containing probes for intronic and exonic regions from the same genomic locus. Statistical analyses were performed with *Significance Analysis of Microarrays* and *patient leave-one-out cross-validation* techniques. Differentially expressed protein-coding genes and lncRNAs were identified by comparing three subgroups of pre- and post-treatment samples from R and NR. Next, each set of differentially expressed transcripts was analyzed by using the *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) software for identifying significantly enriched biological functions, gene networks and canonical pathways. Amongst the transcripts found as differentially expressed between R and NR are *ABCF2*, *PAWR*, *ncCD44*, *ncTNFAIP8*, and *ncFOXO3A* in the dasatinib study and *LEF1*, *BCL2*, *FYN*, *ncPXN*, *ncNCAM1*, and *ncRASEF* in the IM study. Nevertheless, in the IM study, the sets of differentially expressed transcripts were not capable of entirely distinguishing between responder and non-responders cases. In the present study differentially expressed transcripts between responder and non-responders' samples treated with dasatinib and IM were identified, and it suggests that lncRNAs play an important role in the molecular mechanisms of resistance. Further investigations are necessary to confirm these findings.



## *Introdução*

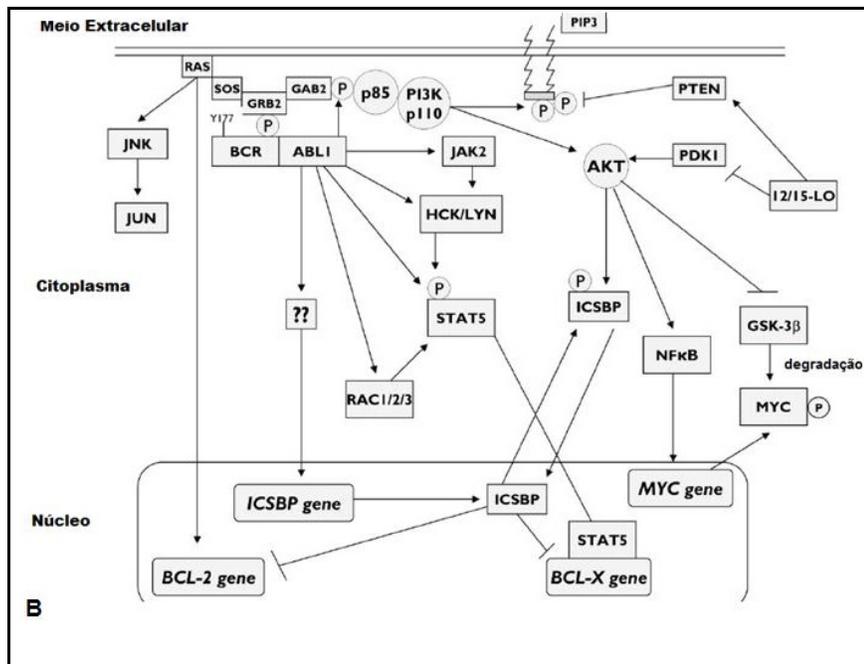
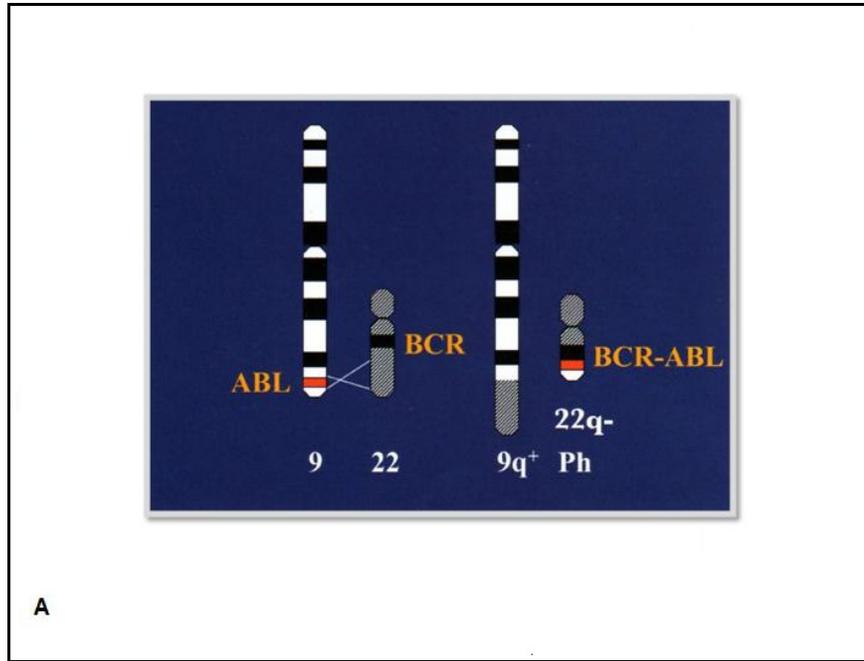
---



## **1. Mecanismos de resistência aos inibidores de tirosinoquinases no tratamento da leucemia mieloide crônica**

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem clonal da célula-tronco hematopoiética pluripotente (1). A LMC é caracterizada por três fases clínicas distintas. Na fase crônica (FC), ainda ocorre produção de granulócitos maduros, porém células progenitoras mieloides são observadas em elevado número no sangue periférico. Após 4 a 5 anos a doença progride para fase acelerada (FA) caracterizada pelo aumento do número de células mieloides imaturas e com menor índice de resposta ao tratamento. Na próxima etapa, crise blástica (CB), a diferenciação é completamente bloqueada e ocorre uma rápida expansão da população de blastos de linhagem mieloide ou linfoide (1-3).

A alteração genética característica da LMC é o cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultante da translocação recíproca entre a região q34 do cromossomo 9 e a região q11 do cromossomo 22  $t(9;22)(q34;q11)$ . Este cromossomo foi a primeira anormalidade cromossômica associada a uma doença maligna e específica em humanos. A primeira descrição de um cromossomo 22 pequeno foi feita em 1960 (4) e da translocação em 1973 (5). O cromossomo Ph é formado pela justaposição de sequências de DNA dos genes *BCR* e *ABL*, respectivamente, dos cromossomos 9 e 22 (Figura 1A). O gene híbrido resultante, *BCR-ABL*, codifica uma oncoproteína com atividade tirosinoquinase desregulada (6).



**Figura 1.** Formação do oncogene *BCR-ABL* e sinalização molecular em progenitores mieloides positivos para *BCR-ABL*. (A) Ilustração esquemática da t(9;22) e do cromossomo Philadelphia resultante. (B) Exemplos de vias de sinalização ativadas em decorrência da atividade proteica *BCR-ABL* desregulada. Modificado de Druker, 2008 (7) e Quintás-Cardama et al., 2009 (8).

Tirosinoquinasas são enzimas que transferem o fosfato da adenosina trifosfato (ATP) para aminoácidos específicos de proteínas tidas como substrato. A fosforilação dessas proteínas leva à ativação de vias de transdução de sinais, as quais possuem papel fundamental em vários processos biológicos, incluindo crescimento, diferenciação e morte celular.

A relação entre a atividade desregulada de BCR-ABL e o desenvolvimento da LMC se deu inicialmente pela investigação dos efeitos da ação de dois produtos oncogênicos, p185<sup>BCR-ABL</sup> e p210<sup>BCR-ABL</sup>, e em seguida pela demonstração em modelos animais (9, 10). A atividade desregulada de BCR-ABL leva à ativação de múltiplas vias de transdução de sinais ocasionando proliferação celular desregulada, redução da aderência de células leucêmicas ao estroma da medula óssea e redução da resposta apoptótica (Figura 1B) (1, 8).

Vários projetos foram desenvolvidos pela Ciba Geigy (Novartis) no início dos anos 90 com o objetivo de identificar compostos inibidores da atividade de proteínas quinases. Um deles, cujo alvo era a proteína quinase C, revelou um derivado da 2-fenilaminopirimidina como composto principal, porém com baixa potência e fraca especificidade. Após várias modificações e sínteses de uma série de derivados, um composto com atividade acentuada contra tirosinoquinasas foi identificado, sendo também inibidor de ABL. O composto final STI571 (Mesilato de imatinibe; Glivec/Gleevec; Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ) mostrou-se um inibidor específico das tirosinoquinasas ABL, incluindo ABL celular, ABL viral ( $\nu$ -ABL) e BCR-ABL (11).

A ligação do Mesilato de imatinibe (IM) ocorre no mesmo sítio ao qual o ATP se liga à proteína BCR-ABL. A droga impede que a proteína transfira os fosfatos do ATP aos

seus substratos, afetando diretamente a transdução de sinais. A proliferação celular é então reduzida e os mecanismos de apoptose induzidos. Análises estruturais do complexo formado pelo domínio catalítico da região ABL com o IM mostraram que os efeitos inibitórios são produzidos quando a droga se liga e estabiliza a forma inativa da proteína (12-14).

A resposta ao tratamento da LMC pode ser expressa em três níveis: a) resposta hematológica, definida como normalização do sangue periférico e desaparecimento de sinais e sintomas de leucemia por pelo menos quatro semanas; b) resposta citogenética, definida pela porcentagem de metáfases Ph+ na medula óssea, podendo ser completa (RCC: 0% de Ph+), parcial (RCP: 1% - 35% de Ph+), menor (36% - 65% de Ph+), mínima (66% - 95% Ph+) ou nula (> 95% de Ph+); c) resposta molecular, definida pela proporção entre transcritos BCR-ABL e transcritos do gene controle, detectados por qPCR (15).

O estudo IRIS [*International Randomized study of interferon- $\alpha$  + citarabina versus STI571 (IM)*] randomizou 1106 pacientes recém-diagnosticados com LMC-FC em dois grupos de tratamento, 553 pacientes com IM e 553 pacientes com Interferon- $\alpha$  (IFN) + citarabina. Os primeiros resultados aos 18 meses de tratamento mostraram que a taxa estimada de RCM foi de 87% no braço do IM e de 35% no braço do IFN- $\alpha$  + citarabina, enquanto a taxa estimada de RCC foi de 76% no grupo dos pacientes tratados com IM e de apenas 15% dos tratados com IFN- $\alpha$  + citarabina ( $p < 0.001$ ) (16). Os resultados aos seis anos do estudo mostraram uma alta eficácia do tratamento com IM, com 82% de taxa acumulada de RCC, 83% de taxa estimada de sobrevida livre de evento e de 93% de sobrevida livre de transformação (17). Este estudo estabeleceu o IM como primeira linha de tratamento da LMC.

Recomendações para o tratamento e acompanhamento de pacientes com LMC foram realizadas por um grupo de especialistas da LeukemiaNet em 2006 (15) e atualizadas em 2009 (18). Estas recomendações referem-se a pacientes em Fase Crônica Precoce (FCP) tratados em primeira linha com 400 mg de IM/dia (Tabela 1). De acordo com a resposta em cada fase do tratamento, o paciente pode ser classificado com resposta ótima, subótima ou falha. Resposta subótima significa que o paciente ainda pode ter um benefício a longo termo permanecendo no tratamento, mas as chances de uma evolução ótima são reduzidas. A dose pode ser mantida ou aumentada, bem como uma terapia alternativa ser indicada. Falha significa que uma evolução favorável é improvável e que o paciente deverá receber um tratamento diferente. Alertas significam que algumas características da doença podem afetar adversamente a resposta ao tratamento e requerem um monitoramento mais cuidadoso (18).

**Tabela 1.** Definição e avaliação da resposta de pacientes com LMC-FCP ao tratamento de primeira linha com IM segundo as recomendações da LeukemiaNet (2009).

<b>Definição da Resposta ao IM</b>				
	<b>Resposta Hematológica</b>	<b>Resposta Citogenética</b>	<b>Resposta Molecular</b>	
	Completa: Plaquetas < 450 X 10 <sup>9</sup> /L; Leucócitos < 10 X 10 <sup>9</sup> /L; Contagem diferencial sem granulócitos imaturos e com menos de 5% basófilos; Baço não apalpável	Completa: 0% Ph+ Parcial: 1% - 35% Ph+ Menor: 36% - 65% Ph+ Mínima: 66% - 95% Ph+ Nula: > 95% Ph+	Completa: transcritos BCR-ABL não detectáveis por PCR quantitativo em tempo real e/ou nested PCR confirmados em duas amostras consecutivas de boa qualidade Maior: razão entre <i>BCR-ABL</i> e <i>ABL</i> ≤ 0,1% na escala internacional	
<b>Avaliação da Resposta ao IM</b>				
<b>Tempo de Avaliação</b>	<b>Resposta Ótima</b>	<b>Resposta Subótima</b>	<b>Falha</b>	<b>Alertas</b>
Diagnóstico	NA	NA	NA	Alto risco; ACC nas células Ph+*
3 meses após diagnóstico	RHC e pelo menos RCM <sub>e</sub> (Ph+ ≤ 65%)	Sem RC (Ph+ > 95%)	Menos que RHC	NA
6 meses após diagnóstico	Pelo menos RCP (Ph+ ≤ 35%)	Menos que RCP (Ph+ > 35%)	Sem RC (Ph+ > 95%)	NA
12 meses após diagnóstico	RCC	RCP (Ph+ 1%-35%)	Menos que RCP (Ph+ > 35%)	Menos que RMM
18 meses após diagnóstico	RMM	Menos que RMM	Menos que RCC	NA
Qualquer tempo durante o tratamento	RMM estável ou melhorando	Perda de RMM; mutações‡	Perda de RHC, perda de RCC, mutações§; ACC nas células Ph+	Aumento dos níveis de transcritos; ACC em células Ph-

NA: não aplicável; ACC: Anormalidade Cromossômica Clonal; Ph: cromossomo Philadelphia; RHC: Resposta Hematológica Completa; RCM<sub>e</sub>: Resposta Citogenética Menor; RC: Resposta Citogenética; RCP: Resposta Citogenética Parcial; RCC: Resposta Citogenética Completa; RMM: Resposta Molecular Maior; \*ACC/Ph+: é um fator de alerta ao diagnóstico, embora sua ocorrência durante o tratamento (isto é, progressão clonal) é um marcador de falha. Dois resultados citogenéticos consecutivos devem confirmar a mesma

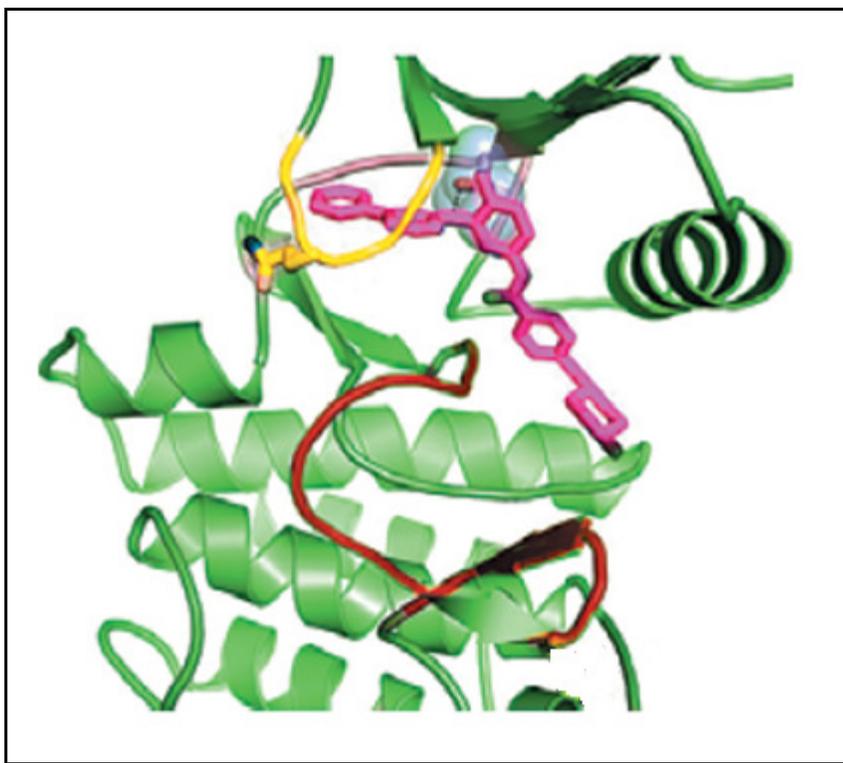
alteração em pelo menos duas células Ph+; ‡mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* sensíveis ao IM; §mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* pouco sensíveis ao IM.

Embora altas taxas de resposta sejam observadas em pacientes em FC que recebem tratamento com IM, é estimado que 20% a 30% destes pacientes eventualmente desenvolverão resistência ao tratamento (19, 20). Resistência hematológica primária é caracterizada pela falha em alcançar resposta hematológica completa (RHC) aos 3 meses, enquanto resistência citogenética primária como falha em alcançar qualquer resposta citogenética aos 6 meses, RCP aos 12 meses ou RCC aos 18 meses de tratamento. A resistência secundária (ou adquirida) é definida como perda da RHC ou RCC ou progressão da doença em qualquer momento do tratamento (21).

A resistência ao IM é um processo multifatorial, que inclui alteração da disponibilidade intracelular do composto causada por mecanismos de influxo e efluxo de drogas, amplificação e/ou superexpressão de *BCR-ABL*, evolução clonal, mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* e ativação de vias de sinalização alternativas (22-27). As mutações são identificadas em 30 a 90% dos pacientes com resistência e até o momento aproximadamente 100 mutações diferentes foram descritas (21, 28).

Mutações foram identificadas inicialmente em pacientes com LMC-CB e pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) Ph+ que recaíram durante o tratamento com IM. O sequenciamento do domínio quinásico *BCR-ABL* mostrou a troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 944 de *ABL* (correspondente ao aminoácido 315) em seis pacientes (22).

A substituição da citosina pela timina gera a troca do aminoácido treonina pela isoleucina na posição 315. A treonina forma uma ponte de hidrogênio crucial com o IM, interação que é interrompida pela falta de um átomo de oxigênio na isoleucina. Além disso, o maior volume da isoleucina faz com que ocorra um choque alostérico entre a cadeia lateral do aminoácido e o IM, resultando em uma completa insensibilidade a este composto (11, 14) (Figura 2).



**Figura 2.** Estrutura tridimensional da quinase ABL ligada ao IM. A estrutura do IM está representada em rosa. A região *P-loop* de ABL está ilustrada em amarelo e a região *A-loop* em vermelho. A troca da timina pela isoleucina na mutação T315I (em azul) faz com que haja aumento do volume do resíduo, prejudicando a ligação com o IM. Modificado de Talpaz et al. (2006) (29).

Na conformação inativa de BCR-ABL, a região *A-loop* (aminoácidos 381 a 402 da ABL), principal elemento regulador do domínio quinásico, bloqueia o centro catalítico. Mutações que ocorrem nesta região desestabilizam a quinase ou a impedem de atingir a conformação inativa, impossibilitando a ligação entre BCR-ABL e IM. O reconhecimento da conformação inativa pelo IM é responsável pela alta seletividade deste composto pela BCR-ABL, visto que a diversidade das quinases se dá quando adotam esta conformação (11, 14).

A região *P-loop* é extremamente flexível, com estrutura rica em glicina e um local de acomodação para os grupos fosfatos do ATP (Deininger et al., 2007). Dois intervalos de aminoácidos, 244-255 e 248-255, são encontrados em estudos que relatam mutações nesta região. Algumas mutações *P-loop* conferem um alto nível de insensibilidade ao IM e estão associadas a um pior prognóstico em alguns estudos (13, 30).

As mutações também podem ocorrer no domínio catalítico (aminoácidos 350 a 363), tendo impacto na atividade da tirosinoquinase. Duas das mutações desta região, M351T e F359V, estão entre as encontradas com mais frequência (21).

No entanto, é importante observar que somente a presença de uma mutação BCR-ABL não leva necessariamente à resistência clínica, sendo o nível de resistência dependente da sensibilidade da mutação ao IM (31). A maioria dos estudos relata que mutações como L248V, G250E e E255K/V, localizadas na região *P-loop*, bem como a mutação T315I estão associadas a uma pior sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP) (13, 30, 32).

Diversas mutações que conferem insensibilidade ou resistência ao IM e a outros inibidores de tirosinoquinases (TKIs) como dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe foram identificadas por estudos *in vitro* (33, 34). Porém, o potencial observado *in vitro* nem sempre traduz a resposta *in vivo*, em parte porque os ensaios *in vitro* não predizem as concentrações dos compostos no plasma ou nas células alvos. Decisões terapêuticas em relação à seleção de inibidores de segunda geração não devem utilizar unicamente os valores de IC<sub>50</sub> como referência (31, 35).

Ainda, a presença do clone mutante não necessariamente confere vantagem proliferativa e nem sempre está relacionada à resistência ao IM. Khorashad et al. (36) quantificaram por pirosequenciamento alelos mutantes e não mutantes de 12 pacientes e observaram três padrões de cinética. No primeiro grupo, foram identificados níveis altos de transcritos BCR-ABL com a predominância de alelos mutantes, sendo a resistência ao IM, neste caso, claramente associada à presença da mutação. No segundo grupo, o número total de transcritos BCR-ABL encontrado foi baixo, semelhante ao de pacientes com RCC, porém os alelos mutantes foram predominantes. No terceiro grupo, o nível dos transcritos BCR-ABL permaneceu alto em alguns pacientes, e baixo em outros, porém poucos clones mutantes foram identificados em ambos os casos. Nestes dois últimos grupos, os autores sugerem que a presença de mutações provavelmente não teve papel significativo na resistência ao IM.

Enquanto a mutação T315I confere claramente resistência ao IM, sendo os pacientes indicados ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) ou ao tratamento com novas drogas capazes de inibir a atividade de T315I, como o ponatinibe, é possível observar casos em que pacientes com uma mesma mutação apresentam diferentes

respostas ao IM. Portanto é provável que além das mutações observadas, outros mecanismos estejam implicados no fenômeno de resistência (36).

Uma das estratégias para superar a resistência ao IM foi o desenvolvimento dos inibidores de tirosinoquinases de segunda geração, nilotinibe e dasatinibe. O dasatinibe (Sprycel; Bristol-Myers-Squibb, Princeton, NJ) se liga ao domínio quinásico ABL em uma posição similar ao IM, mas com menos pontos de contato. Possui ainda a vantagem de necessitar de condições menos específicas da conformação proteica, ligando-se tanto na forma ativa quanto inativa. É um competidor de ATP e possui além da BCR-ABL, atividade contra quinases da família Src (por exemplo, Fyn, Yes e Lyn), PDGF- $\beta$ , EphA2, e c-Kit. O dasatinibe não possui similaridades estruturais com o IM e é de 100 a 300 vezes mais potente na inibição da atividade da quinase BCR-ABL (37, 38).

As quinases Src são tirosinoquinases não receptoras intracelulares envolvidas nas transduções de sinais de múltiplas vias relacionadas ao crescimento, diferenciação, progressão e sobrevivência. Análises de amostras coletadas antes e após a detecção de falha com IM revelaram que a ativação das Src ocorre durante a progressão da doença podendo causar resistência de forma independente à atividade de BCR-ABL (38).

O dasatinibe foi mais potente que o IM na inibição da atividade quinásica em um ensaio com células Ba/F3 contendo *BCR-ABL* não mutante (*BCR-ABL* selvagem). Além disso, o uso de baixas concentrações da droga inibiu a atividade quinásica de 14 das 15 isoformas BCR-ABL resistentes ao IM testadas. A única forma claramente resistente ao dasatinibe foi o mutante T315I, o qual reteve a atividade quinásica mesmo na presença de concentrações na ordem de  $\mu\text{M}$  do composto (39).

A eficácia e a segurança do tratamento com dasatinibe foram avaliadas em diversos estudos clínicos envolvendo pacientes em diferentes fases da LMC resistentes e intolerantes ao IM (40, 41). Pacientes com LMC-FC foram avaliados pelo estudo conhecido como START-C, e após o seguimento médio de 15 meses, 91% deles atingiram ou mantiveram RHC, 59% RCM e 49% RCC. As taxas de SLP e SG foram respectivamente de 90% e 96%. Os efeitos colaterais não hematológicos foram diarreia, dor de cabeça, náusea, fadiga, dispneia e derrame pleural (41). Em pacientes com LMC-CB, o seguimento aos 8 meses mostrou RCM de 31% e 50% dos pacientes em crise blástica mieloide e linfoide, respectivamente, sendo que destes, 86% atingiram RCC. Neste estudo, pacientes com ou sem mutações BCR-ABL que conferem resistência ao IM tiveram taxas similares de resposta (40).

A eficácia e a segurança do tratamento com dasatinibe (100 mg/dia) para uso de primeira linha foram comparadas às do IM (400 mg/dia) pelo estudo clínico DASISION. Os pacientes tratados com dasatinibe tiveram taxas superiores de RCC e RMM (resposta molecular maior) quando comparados aos tratados com IM. Aos 12 meses, a taxa confirmada de RCC foi de 77% para o braço do dasatinibe e de 66% para o braço do IM ( $p = 0,007$ ) e as taxas de resposta molecular maior foram de 46% e 28% para os pacientes tratados com dasatinibe e IM, respectivamente (42). Os dados aos 24 meses de seguimento continuaram associando respostas mais rápidas e duradouras ao dasatinibe, sugerindo o uso de 100 mg/dia como primeira linha de tratamento para pacientes recém-diagnosticados com LMC-FC (43).

Um estudo com pacientes que apresentaram resistência ou resposta subótima ao IM mostrou que tais pacientes alcançaram taxas similares de resposta ao dasatinibe,

independente da existência prévia de mutações. Os pacientes com mutações apresentaram taxas notáveis de resposta hematológica, citogenética e molecular, com exceção dos casos identificados com a T315I, que responderam fracamente (44). Por outro lado, o surgimento de novas mutações nos resíduos T315, F317 e V299 durante o tratamento com dasatinibe foi associado à resistência clínica (45-47).

Dados de estudos clínicos desenvolvidos com nilotinibe (Tasigna; Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ) também mostraram a superioridade deste inibidor de segunda geração em relação ao IM. Aos 12 meses as taxas de RMM foram de 44% (300 mg/dia) e de 43% (400 mg/dia) para os pacientes que utilizaram nilotinibe comparados aos 22% para os pacientes no braço do IM ( $p < 0.001$ ) (48). Com relação ao impacto das mutações na resposta ao nilotinibe, o estudo de fase II com pacientes que receberam nilotinibe como segunda linha mostrou que não houve diferença significativa entre as taxas de resposta de pacientes com mutações que conferem alta sensibilidade *in vitro* ou com sensibilidade desconhecida e aqueles sem mutações no início do tratamento. No entanto, os pacientes com mutações que conferem baixa sensibilidade *in vitro* ao nilotinibe (Y253H, E255V/K e F359V/C) tiveram as taxas mais baixas de resposta citogenética, entre 9% e 43% de RCM, tendo nenhum alcançado RCC (49).

Ainda, vários estudos clínicos que utilizam compostos que possuem atividade contra a mutação T315I estão em andamento atualmente, como OMAPRO, AP24534, DCC-2036 e inibidores de aurora quinases (31). Especificamente AP24534, denominado ponatinibe (Ariad Pharmaceuticals), foi desenhado de forma a não formar pontes de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo T315 de ABL como fazem IM, dasatinibe e nilotinibe. Os resultados de ensaios bioquímicos e de proliferação celular revelaram que o

ponatinibe inibiu as células que expressam BCR-ABL selvagem ou mutante, incluindo BCR-ABL<sup>T315I</sup>. Entre as mutações testadas, E255V, que confere alto nível de resistência ao IM e moderada ao dasatinibe e ao nilotinibe foi a mais resistente ao ponatinibe. Por outro lado, este composto inibiu mutantes nos resíduos Y253 e F359, os quais são relatados em pacientes que falham ao tratamento com nilotinibe, e também o mutante F317 relatado em pacientes com resistência ao dasatinibe (50, 51). O estudo clínico de fase I mostrou que nos 43 pacientes com LMC em FC, as taxas de RHC, RCM e RMM foram de 98%, 72% e 44%, respectivamente. Dos 12 pacientes com a mutação T315I, 100% apresentaram RHC e 92% RCM (52). Estudos clínicos de fase II envolveram principalmente dois grupos em FC, o primeiro de pacientes resistentes ou intolerantes ao dasatinibe ou nilotinibe e o segundo de pacientes com a mutação T315I pré-existente. Os resultados mostraram que quanto menos os pacientes foram previamente tratados com TKIs, maiores foram as taxas de respostas apresentadas. Assim, casos tratados anteriormente com um ou dois TKIs tiveram taxas maiores de RCM, RCC e RMM em relação aos tratados com três TKIs (53). Os pacientes em fases avançadas de LMC ou com LLA Ph+ mostraram boa tolerabilidade ao ponatinibe, porém no momento da análise apenas 59% dos pacientes em FA, 8% em CB e 9% com LLA Ph+ permaneciam no estudo. Com relação à RCM, pacientes resistentes/intolerantes ao dasatinibe ou nilotinibe e pacientes com a mutação T315I tiveram respectivamente as seguintes taxas de RCM: 34% e 56% (FA), 18% e 29% (CB) e 60% e 41% (LLA Ph+) (54).

Portanto, tendo em vista que a presença de alguns tipos de mutações no domínio quinásico ABL está diretamente relacionada à resistência ou à insensibilidade ao tratamento

com TKIs, torna-se de extrema importância o monitoramento do status mutacional dos pacientes em uso destas terapias.

## **2. Análises de expressão gênica em LMC pela tecnologia de microarranjos**

A tecnologia de expressão gênica por microarranjos permite a análise simultânea de padrões de transcrição de milhares de genes, os quais podem se tornar marcadores de diagnóstico, prognóstico e progressão de doenças (55, 56).

Golub et al. (57) sugeriram a aplicação dessa metodologia para a classificação de subtipos de câncer e a utilizaram na identificação de subtipos de leucemias de casos ainda não diagnosticados. A leucemia mieloide aguda (LMA) foi diferenciada de LLA e novos casos foram corretamente classificados a partir do desenvolvimento de um sistema de predição. Song et al. (58) procuraram obter novos marcadores para diferenciar todos os tipos de leucemias. Ao avaliarem 65 amostras ao diagnóstico pela análise de clusterização não supervisionada, todas foram devidamente separadas em seus respectivos tipos, LMA, LLA, LMC e leucemia linfocítica crônica (LLC). Especificamente quanto à LMC, alguns estudos estabeleceram padrões de expressão gênica procurando obter genes responsáveis pelas anormalidades biológicas associadas ao *BCR-ABL* (59) ou genes associados aos diferentes estágios da doença (55).

Também através da metodologia de microarranjos vários estudos foram realizados com o intuito de identificar genes relacionados à resposta citogenética com IM. Kaneta et al. (60) desenvolveram um sistema de predição com grupos de 15 ou 30 genes capazes de separar claramente pacientes responsivos e não responsivos. Radich et al. (61) utilizaram

as mudanças no perfil de expressão gênica que ocorrem durante a evolução da FC para a CB para identificar genes e vias que pudessem ser úteis como marcadores de prognóstico. Os autores identificaram perfis semelhantes entre as fases avançadas da doença, sugerindo que a LMC seja uma doença de duas fases ao contrário de três. O mesmo grupo de 3.500 genes diferencialmente expressos entre as fases foi utilizado para estudar pacientes que falharam no tratamento com IM. Os casos que estavam em FC e recaíram após atingirem RCC tiveram padrões de expressão similares aos pacientes em fases avançadas. Além disso, dois casos que apresentavam a mutação T315I também tiveram assinaturas gênicas mais semelhantes às da fase avançada. Ainda, alguns genes (*CTRL*, *MAP21K14*, *CLK3*, *MKNK2*, *FYN* e *ABCC3*) foram exclusivamente associados aos pacientes que recaíram.

Pacientes em FC que anteriormente ao tratamento com IM tiveram recaída ou resistência ao uso de IFN- $\alpha$  foram estudados por Frank et al. (62). O estudo procurou por genes que pudessem ser preditivos na identificação de pacientes que alcançariam RCM no primeiro ano de tratamento e genes que pudessem ser associados à resistência primária ao IM. Diferentes metodologias estatísticas identificaram 128 genes que melhor separaram os dois grupos e que também foram associados à resistência ao IM. Entre eles, estão genes ligados ao reparo de DNA, vias de apoptose (como *CASP9* e *HRAS*), proteção ao estresse oxidativo e formação do centrôssomo.

Nesse mesmo sentido, Villuendas et al. (63) também procuraram por genes que estivessem envolvidos com a resistência ao IM. Porém, neste estudo os pacientes foram divididos em três grupos conforme a RCM: responsivos precoces (6 meses), responsivos tardios (12 meses) e não responsivos. No total, 46 genes foram diferencialmente expressos entre os responsivos e não responsivos e aqueles relacionados à adesão celular e à ativação

de moléculas envolvidas no metabolismo de drogas foram identificados com tendo maior correlação com a resistência ao IM.

### 3. RNAs não codificadores

Novas tecnologias investigativas em larga escala do genoma e do transcriptoma têm possibilitado o mapeamento da atividade transcricional sem a necessidade prévia do conhecimento da localização dos genes (64, 65). Entre essas novas tecnologias, os *tiling arrays* genômicos de alta resolução permitiram a identificação de novas regiões de transcrição ou de isoformas alternativas de genes previamente anotados, bem como a detecção de transcritos que possuem pouca ou nenhuma capacidade codificadora (66, 67).

A identificação do potencial regulatório de regiões não codificadoras modificou todo o conhecimento que se tinha até então da estrutura e codificação da informação genética em organismos complexos, já que tais regiões são consideradas atualmente como sendo a maior parte das unidades transcricionais (68, 69).

Entre os tipos de RNAs não codificadores (ncRNAs) estão os classificados como curtos (< 200 bases) e que possuem várias funções regulatórias, como os microRNAs (miRNAs), RNAs curtos de interferência (siRNAs) e *piwi-interacting RNAs* (piRNAs).

Os miRNAs (20 a 25 bases) regulam a expressão gênica através da clivagem de uma molécula alvo de mRNA ou pela inibição da tradução através da sua complementaridade à extremidade 3' das regiões não traduzidas (UTR) dos mRNAs. Os genes que codificam as moléculas alvos dos miRNAs controlam múltiplos processos biológicos incluindo desenvolvimento, divisão de células tronco, apoptose, doenças e câncer (70). A primeira evidência da influência de miRNAs em câncer foi encontrada em

LLC (71). A partir desse estudo pioneiro, muitos outros miRNAs foram associados a doenças hematopoiéticas (72). Um deles, miR-203, é um supressor tumoral e tem como alvo ABL1 e BCR-ABL1. Em LMC e em alguns casos de LLA de células B ocorre a inibição de miR-203 por mecanismos genéticos e epigenéticos, conferindo vantagem proliferativa a estas desordens (73).

Os siRNAs (21 - 22 bases) formam complexos com proteínas Argonautas e estão envolvidos no silenciamento de transposons, remodelamento da cromatina, defesa antiviral e regulação gênica pós-transcricional. Os piRNAs (25 - 30 bases) também estão envolvidos no controle da atividade de transposons, mas são restritos às células da linhagem germinativa e células vizinhas (74-76).

Os ncRNAs longos (> 200 bases) são transcritos a partir de regiões intrônicas, intergênicas ou não traduzidas (UTRs), na fita senso e antissenso (77). A expressão de ncRNAs longos (lncRNAs) parece ser tecido-específica, podendo ser alterada por estímulos ambientais e estar desregulada em diversos tipos de câncer humano (69). Diversos estudos funcionais envolvendo lncRNAs mostram que estes transcritos funcionam como mediadores da regulação da expressão gênica, no nível transcricional ou pós-transcricional. Ainda, a regulação pode ser realizada em *cis*, quando o controle da expressão é específica ao *locus* em que o lncRNA é transcrito, ou em *trans*, quando a regulação ocorre em um ponto distante do genoma em relação ao seu local de transcrição (69, 78).

O número de estudos relacionados à expressão alterada de lncRNAs em tumores aumentou consideravelmente nos últimos anos (79). Como exemplos, podemos citar HOTAIR (*HOX antisense intergenic RNA*), que é originado no *locus HOXC* e silencia a

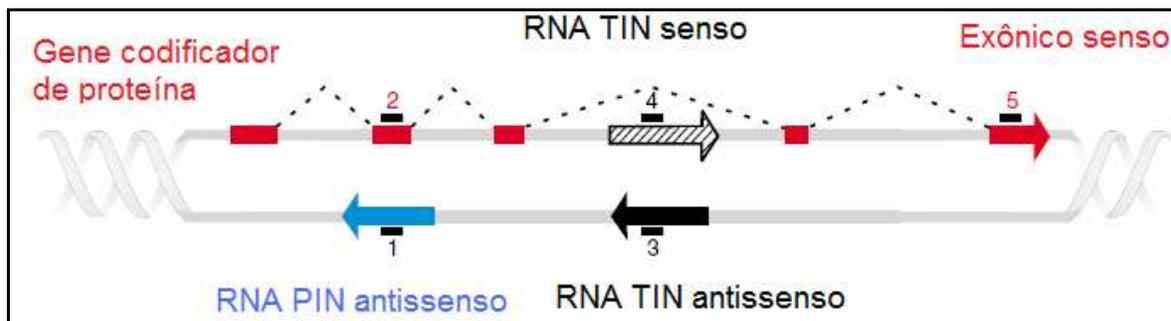
transcrição de *HOXD* em *trans* pelo recrutamento do complexo de remodelamento PRC2, induzindo o estado repressivo da cromatina (80). Altos níveis de expressão de *HOTAIR* foram identificados em tumores primários de mama, sendo preditores de subsequente metástase e morte (81). Yu et al. (82) demonstraram que o lncRNA antissenso (*p15AS*) causa a inibição da expressão gênica de *p15* e induz a proliferação celular através de modificações na heterocromatina em células tronco embrionárias de camundongos. Nesse mesmo estudo, *p15AS* foi identificado com expressão aumentada em pacientes com LLA e LMA em relação aos controles normais, podendo estar relacionado ao desenvolvimento destes tipos de leucemia.

Os lncRNAs transcritos de regiões intrônicas receberam menos atenção da comunidade científica possivelmente pela percepção equivocada de que se tratavam de RNAs imaturos (69). Evidências da atividade transcricional intrônica foram reveladas a partir de estudos mais detalhados na extensão dos cromossomos 21 e 22, sendo que metade dos transcritos intrônicos identificados era expressa no sentido antissenso em relação aos seus respectivos íntrons (64, 83).

Com o objetivo de estudar o perfil transcricional de mensagens intrônicas em câncer de próstata, Reis et al. (84) utilizaram um microarranjo customizado de cDNA enriquecido com transcritos que mapeavam em regiões intrônicas de segmentos de genes conhecidos e que foram selecionados a partir do banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) gerado pelo Projeto Genoma Humano do Câncer (85). Entre os 56 transcritos que foram encontrados como significativamente correlacionados ao grau de diferenciação do tumor de próstata, 23 foram lncRNAs que mapeavam em regiões intrônicas.

Ainda, o grupo do pesquisador Sergio Verjovski-Almeida, ao qual este trabalho está vinculado, examinou os achados dos projetos de análise de expressão gênica em larga escala que levaram à identificação dos ncRNAs intrônicos. Através do mapeamento genômico e da fusão das sequências em sobreposição, foi possível definir agrupamentos de ESTs (Expressed Sequence Tags) totalmente contidos em regiões intrônicas (86). A partir desta investigação foi desenvolvido um *oligoarray* com 44.000 elementos contendo sondas senso e antissenso para ncRNAs intrônicos longos e para os seus respectivos genes codificadores de proteína (Figura 3). Nakaya et al. (87) utilizando este *oligoarray* mostraram que tecidos de próstata, rim e fígado possuem assinaturas específicas de expressão exônica e intrônica. Os transcritos totalmente intrônicos (TIN) e antissenso mais expressos e exclusivos de cada tecido foram relacionados à categoria de regulação de transcrição pelo *Gene Ontology*. Os autores também sugeriram que níveis similares de RNAs parcialmente intrônicos (43) antissenso e dos seus respectivos éxons codificadores de proteína poderiam indicar que os ncRNAs intrônicos possuem funções moduladoras da taxa de transcrição ou estabilizadoras dos transcritos codificadores.

Mais recentemente Tahira et al. (88) identificaram assinaturas de expressão de genes codificadores de proteína e lncRNAs intrônicos e intergênicos correlacionados com adenocarcinoma ductal pancreático e metástase de câncer pancreático.



**Figura 3.** Ilustração esquemática das orientações dos elementos presentes no *oligorray* desenhado por Nakaya et al. (2007). O número 1 representa a sonda para os transcritos antissenso PIN (parcialmente intrônicos). As sondas 2 e 5 são para transcritos codificadores de proteínas. As sondas 3 e 4 formam um par de seqüências complementares e que foram desenhadas para detectar transcritos TIN (totalmente intrônicos) senso e antissenso de um dado *locus*. Adaptado de Nakaya et al. (87).

A caracterização da expressão de lncRNAs ao longo do genoma humano e mais recentemente em diversos tipos de câncer, nos levou a avaliar um possível papel dessa classe de transcritos nos processos relacionados à resistência ao dasatinibe e ao IM em pacientes com LMC. Para isto, utilizamos as plataformas de microarranjos *Whole Human Genome G4112F* e a customizada intrônica-exônica (87) para identificarmos genes codificadores de proteína e lncRNAs intrônicos diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe e ao IM. Pacientes resistentes foram também avaliados quanto à presença de mutações no domínio quinásico *BCR-ABL*, uma das causas de resistência ao tratamento com TKIs.



*Objetivos*

---



## Objetivo Geral

Avaliar possíveis mecanismos de resistência em pacientes com LMC ao tratamento com inibidores de tirosinoquinases através da pesquisa de mutações no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* e da identificação de alterações na expressão de transcritos codificadores e não codificadores de proteínas.

## Objetivos Específicos

1. Avaliar a frequência de mutações no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* em pacientes com LMC resistentes ao IM ou a outros inibidores;
2. Correlacionar o tipo de mutação com as características clínicas e laboratoriais e com o prognóstico dos pacientes;
3. Identificar genes codificadores de proteína e RNAs longos não codificadores intrônicos diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe após resistência ao imatinibe;
4. Realizar análise funcional *in silico* dos conjuntos de transcritos diferencialmente expressos identificados no estudo com dasatinibe através do uso de ferramentas de análises de ontologia e interação gênicas;
5. Identificar genes codificadores de proteína e RNAs longos não codificadores intrônicos diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes classificados como responsivos e não responsivos ao imatinibe;

6. Realizar análise funcional *in silico* dos conjuntos de transcritos diferencialmente expressos identificados no estudo com imatinibe através do uso de ferramentas de análises de ontologia e interação gênicas;
7. Identificar genes codificadores de proteína e RNAs longos não codificadores potencialmente envolvidos em mecanismos de resistência ao tratamento com IM ou dasatinibe em LMC.

## *Pacientes e Métodos*

---



## **1. Pesquisa de mutações no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* em pacientes resistentes ao tratamento com TKIs**

### **1.1. Pacientes**

A pesquisa de mutações no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* foi realizada a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com LMC acompanhados no Hemocentro da UNICAMP e tratados com TKIs. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer n.º 408/2003) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

### **1.2. Critérios de classificação**

As definições de FC, FA e CB utilizadas foram as estabelecidas pela classificação WHO (89). Fase Crônica Precoce (FCP) e Fase Crônica Tardia (FCT) foram definidas de acordo com o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento com IM, sendo FCP se < 6 meses ou FCT se > 6 meses. As definições de resposta hematológica, citogenética e molecular, bem como as de resposta subótima e falha foram as estabelecidas pelo grupo LeukemiaNet (Tabela 1) (18).

Neste estudo foram incluídos pacientes que apresentaram resposta subótima ou falha com IM, pacientes resistentes ao dasatinibe ou nilotinibe e pacientes que iniciaram tratamento com TKIs em fases avançadas da doença.

### **1.3. Coleta das amostras e lise das hemácias**

Foram coletados de 10 a 20mL de sangue periférico em EDTA de pacientes com LMC. As amostras foram processadas em no máximo 24 horas. As amostras foram centrifugadas a 2500rpm por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do plasma, foi adicionada solução de lise (a partir da mistura preparada no momento de uso de 8 volumes de NH<sub>4</sub>Cl 0,144M para cada volume de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,01M). Os tubos foram agitados vigorosamente, mantidos no gelo por 15 minutos e centrifugados a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Após a retirada do sobrenadante e nova adição de solução de lise, os tubos foram centrifugados novamente a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Esse processo foi repetido até a obtenção do botão de leucócitos livre de hemoglobina. Aproximadamente 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi então adicionado e as amostras armazenadas a - 80°C.

Em alguns casos foram utilizadas amostras de células mononucleares obtidas a partir de sangue total para a pesquisa de mutações no domínio quinásico BCR-ABL. O procedimento seguido está descrito no item 2.2.

### **1.4. Extração de RNA**

A metodologia foi adaptada a partir das recomendações do fabricante para uso do reagente Trizol (Invitrogen). As amostras foram mantidas em termobloco a 37°C por 5 minutos e após a adição de 350uL de clorofórmio, foram agitadas vigorosamente, mantidas em gelo por 3 minutos e centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e transferido para um novo tubo. Seguiu-se adição de 350uL de isopropanol e agitação dos tubos. As amostras foram mantidas em gelo por mais 10

minutos e centrifugadas a 12000g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas por 7500g a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Os tubos foram abertos, vertidos e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos para a secagem. As amostras de RNA foram solubilizadas com 20 a 40uL de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC, mantidas a 55°C por 10 minutos.

Após o processo de extração, o grau de pureza e a quantificação do RNA foram avaliados por espectrofotometria a partir do equipamento NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

### **1.5. Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA foram adicionados 1μL de hexâmeros randômicos (100μM) e volume de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC suficiente para perfazer 1ug de RNA total em um volume de 11μL. Os tubos foram mantidos em termociclador a 70°C por 10 minutos. A seguir os demais reagentes foram adicionados de forma a atingir a concentração final de 1X de solução tampão, 0,01M de DTT e 500μM de cada um dos dNTPs. Os tubos foram mantidos a 42°C por 2 minutos. A seguir, 200U de *SuperScript II* (Invitrogen) foram adicionadas à solução totalizando 20μL de reação. Os tubos foram mantidos a 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos.

Para verificação da integridade do cDNA obtido, realizamos uma reação de PCR com amplificação da β2microglobulina. Os volumes dos reagentes foram calculados de forma a conter 1X solução tampão (10X *PCR Reaction Buffer*), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200μM de

cada um dos dNTPs, 200nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 1,25U de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) no volume final de 50µL. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão relacionadas na Tabela 2.

A ciclagem utilizada foi a seguinte: 1) 94°C por 5min; 2) 94°C por 40s; 3) 55°C por 1min; 4) 72°C por 1min; 5) 40 ciclos das etapas 2, 3 e 4; 6) 72°C por 7min.

### **1.6. PCR semi-nested para amplificação da região do domínio quinásico *BCR-ABL***

A amplificação da região do domínio quinásico *BCR-ABL* foi realizada pela metodologia PCR semi-nested que utiliza o mesmo oligonucleotídeo iniciador antissenso em duas etapas de reação. Para a primeira reação de PCR (PCR 1) utilizamos o volume final de 50µL contendo 1µL de *Elongase Enzyme Mix* (Invitrogen), soluções tampão (5X *Buffer A* e 5X *Buffer B*) perfazendo a concentração final de 1,8mM de MgSO<sub>4</sub>, 200µM de cada um dos dNTPs e alíquota de 1µL de cada cDNA apropriado. Para a segunda etapa, utilizamos 1µL do produto da primeira reação de PCR. A concentração final dos demais reagentes foi de 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada um dos dNTPs e 1X solução tampão (10X *PCR Buffer*). Ao final, 1U da DNA Polimerase (BioTools, Madrid, Spain) foi utilizada num volume final de reação de 50µL. Os oligonucleotídeos iniciadores adicionados em cada etapa estão descritos na Tabela 2. A concentração final de cada um deles nas respectivas reações foi de 200nM. O domínio quinásico completo após a segunda etapa de reação incluiu 863 pares de bases (pb).

Os programas para as reações foram os seguintes:

- PCR 1: 1) 94°C por 30s; 2) 94°C por 30s; 3) 54°C por 45s; 4) 68°C por 4min; 5) 40 ciclos das etapas 2, 3 e 4; 6) 68°C por 5min.

- PCR 2: 1) 94°C por 30s; 2) 94°C por 30s; 3) 57 °C por 30s; 4) 72°C por 2min; 5) 35 ciclos das etapas 2, 3 e 4; 6) 72°C por 10min.

Os produtos de ambas as reações foram analisados em gel de agarose 2% com brometo de etídeo. Quando foi possível visualizar o produto amplificado após a primeira etapa de PCR, a reação de sequenciamento foi realizada a partir destas amostras.

### **1.7. Purificação dos produtos da PCR**

Após a segunda reação de PCR, os produtos foram purificados com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* segundo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences, U.K.).

### **1.8. Quantificação das amostras para sequenciamento direto**

A quantificação dos produtos amplificados e purificados foi realizada em gel de agarose a partir da comparação com o marcador *Low Mass* (Invitrogen). Foram aplicados 4µL de cada amostra amplificada e do marcador. O volume necessário para alcançar 40 ng de DNA foi calculado a partir das intensidades das bandas.

### 1.9. Reação de sequenciamento

A reação foi preparada para o volume final de 15 $\mu$ L com 1 $\mu$ L de um dos oligonucleotídeos iniciadores (10 $\mu$ M), 4 $\mu$ L da solução *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit* para análises com o equipamento *Megabace* (Amersham BioSciences) e 40ng do produto purificado. O programa da reação em termociclador automático foi o seguinte: 1) 94°C por 2min; 2) 94°C por 20s; 3) 55°C por 15s; 4) 60°C por 1min; 5) 35 ciclos das etapas 2, 3 e 4.

Além dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na segunda etapa de PCR, outros dois internos foram desenhados para reação de sequenciamento (Tabela 2). Portanto, para cada amostra foram realizadas quatro reações individuais.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo de avaliação de mutações no gene *BCR-ABL*.

<b>Etapa</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Sequências dos iniciadores</b>
<i>Verificação da integridade de cDNA</i>	$\beta$ -2-microglobulina (senso)	5'-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC-3'
	$\beta$ -2-microglobulina (antissenso)	5'-ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT-3'
<i>Reação de PCR 1</i>	BCRF (senso)	5'-TGACCAACTCGTGTGTGAAACTC-3'
	ABL (antissenso)	5'-TCCACTTCGTCTGAGATACTGGATT-3'
<i>Reação de PCR 2 e Sequenciamento</i>	ABL (senso)	5'-CGCAACAAGCCCACTGTCT-3'
	ABL (antissenso)	5'-TCCACTTCGTCTGAGATACTGGATT-3'
<i>Reação de Sequenciamento</i>	ABL (senso)	5'-ACGCCGTGGTGCTGCTGT-3'
	ABL (antissenso)	5'-TCTCCCCTACCAGGCAGTTT-3'

### **1.10. Precipitação dos produtos amplificados e sequenciamento direto automatizado**

A precipitação dos produtos da reação de sequenciamento foi iniciada pela adição de 2µL de acetato de amônio 7,5M e 50µL de etanol a 100%. A placa contendo os produtos foi então mantida no escuro por 20 minutos a 4°C. Após centrifugação a 4000rpm a 4°C por 40 minutos, a placa foi invertida vagarosamente e 100µL de etanol 70% foram adicionados. Procedeu-se nova centrifugação a 4000rpm por 15 minutos a 4°C e a placa foi mais uma vez invertida manualmente. O excesso de etanol foi retirado com um *spin* invertido de 5 segundos a 200rpm. Após secagem em temperatura ambiente e no escuro, 10µL do *Loading Solution* foram adicionados em cada poço e a placa encaminhada para a realização do sequenciamento no equipamento Megabace (Amersham BioSciences).

### **1.11. Análise das sequências**

As seqüências foram analisadas de três formas ao longo deste estudo. Inicialmente o programa Chromas 2.31 (Technelysium Pty Ltda) foi utilizado para abrir os cromatogramas gerados após o sequenciamento. Cada seqüência foi comparada à do gene *ABL* (número de acesso M14752 no GenBank) pela ferramenta *BLAST* (*The Basic Local Alignment Search Tool*).

A segunda análise foi realizada pelo programa *Phred/Phrap* com o auxílio técnico do aluno de Doutorado Ramon O. Vidal do laboratório de Genômica e Expressão (Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP) de responsabilidade do Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. O programa produz seqüências na forma de cromatogramas consistindo de quatro curvas, cada uma

representando um sinal para cada das quatro bases. O procedimento envolve a determinação da localização ideal dos picos, seguida pela identificação daqueles que realmente foram observados no sequenciamento. Então, uma comparação é realizada entre os dois tipos de picos, o ideal e o observado. Além disso, nessa etapa é definida a ordem da sequência de acordo com o arranjo apresentado por cada base observada. Como último passo, os picos não definidos em razão de problemas técnicos, são checados e associados a um padrão de base mais próximo. A partir dessa organização, o programa assinala erros de probabilidade para cada base. Os arquivos produzidos pelo *Phred* são então reunidos pelo *Phrap* (90, 91).

E, por último, em função das várias dificuldades técnicas surgidas durante a padronização desta metodologia no nosso laboratório, parte das amostras foi também avaliada no *Fred Hutchinson Cancer Research Center* em Seattle/EUA. As sequências obtidas foram analisadas pelo programa *Mutation Surveyor* utilizando como referência a versão do gene *ABL* humano NM\_007313 disponível no banco de dados NCBI, gi#62362411.

Todos os casos com mutações detectadas no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* tiveram suas amostras reanalisadas a partir da etapa de síntese de cDNA para confirmação.

## **1.12. Análise Estatística**

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva exploratória. Os testes de Pearson, Spearman e Fisher foram aplicados com variáveis categóricas ou dicotômicas, enquanto que variáveis contínuas foram comparadas usando o teste T-Student (dois grupos) ou Kruskal-

Wallis (mais de dois grupos). As análises de sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida livre de evento (SLE) foram realizadas pelo método de Kaplan e Meier e comparadas com o teste de log-rank. As análises foram realizadas através do software estatístico SPSS (statistical package social science) versão 14.0.

As análises de SG, SLE e SLP foram realizadas em dois blocos considerando dois pontos de início. Para o primeiro, as análises foram feitas a partir da data da pesquisa para mutação, sendo SG calculada até a data da última consulta ou data do óbito (morte por qualquer causa); SLP até a data de progressão para FA/CB, óbito ou última consulta, sendo considerado evento somente progressão ou morte; SLE até a última consulta ou ocorrência do primeiro evento (perda de RH, perda de RC, progressão ou morte por qualquer razão). No segundo bloco, foi feito um recorte na análise, focando o período de uso do IM. As curvas foram calculadas considerando início e fim do IM, sendo os eventos considerados neste período.

A regressão de Cox univariada e multivariada foi realizada pelo método stepwise backward Wald e aplicada na busca de variáveis preditivas no decorrer do tempo, considerando  $p < 0,10$  para análise univariada e  $p < 0,05$  para multivariada. Estas análises foram realizadas apenas a partir da data da pesquisa da mutação.

## **2. Análise da expressão gênica de pacientes responsivos e não responsivos tratados com dasatinibe e IM**

### **2.1. Amostras de pacientes**

O estudo de expressão gênica de células mononucleares de sangue periférico foi realizado a partir de amostras de pacientes diagnosticados com LMC e acompanhados pelo Hemocentro da UNICAMP, no período de Julho de 2005 a Março de 2008. Dois grupos de pacientes foram avaliados. O primeiro foi formado por pacientes tratados com dasatinibe e que apresentaram resistência prévia ao uso de IM e o segundo grupo foi composto por pacientes recém-diagnosticados e que receberam tratamento com IM como primeira linha. As amostras de sangue periférico utilizadas em ambos os estudos foram coletadas pré e pós-tratamento. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas e todos os pacientes assinaram o consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

Os pacientes incluídos no primeiro grupo participaram dos estudos clínicos CA180034 e CA180035 (92, 93) e foram tratados com dasatinibe 100 a 140 mg/dia. Os pacientes que atingiram RCM (0% - 35% Ph+) dentro de 12 meses foram classificados como responsivos (R) e aqueles que falharam em atingir esta resposta ou progrediram para um estágio avançado da doença foram classificados como não responsivos (NR) (15).

Os pacientes incluídos no segundo grupo foram tratados com IM 400 a 800mg/dia. Os pacientes foram avaliados quanto à resposta à terapia em dois momentos, aos 12 meses de tratamento e na data da coleta pós-tratamento, a partir dos critérios estabelecidos pelo

grupo LeukemiaNet (18). Foram considerados para as análises somente os que apresentaram a mesma resposta nas duas avaliações.

## **2.2. Separação das células mononucleares**

Em tubos do tipo Falcon foram adicionados 3mL de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Science) e em seguida 4mL de sangue total. Os tubos foram centrifugados a 1800rpm a 18°C por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a camada de células transferida para novos tubos. Seguiu-se a lise de hemácias com solução apropriada (8 volumes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M para cada volume de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M) e centrifugação a 2000rpm por 10 minutos. A etapa de lise foi repetida várias vezes até a obtenção de um botão livre de hemoglobina. Por último, foi adicionado tampão PBS e novamente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições. As células foram então estabilizadas em 1mL de Trizol Reagent (Invitrogen) e armazenadas a - 80°C.

## **2.3. Extração de RNA**

O procedimento de extração de RNA foi anteriormente descrito no item 1.4.

## **2.4. Quantificação do RNA**

A quantificação foi realizada a partir de 1,5uL da amostra de RNA no espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). O equipamento também forneceu as razões de pureza 260/280 e 260/230.

## **2.5. Análise da integridade do RNA**

A integridade das amostras de RNA foi avaliada através do equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) de acordo com as orientações do fabricante. Esse equipamento realiza uma eletroforese de capilaridade como princípio de funcionamento e utiliza pequenas quantidades de material para a análise. A integridade da amostra é calculada levando-se em consideração a razão entre os rRNAs 28S e 18S a partir das medidas das respectivas áreas dos picos do eletroferograma e o traçado eletroforético da amostra. O programa *2100 Expert* (Agilent Technologies) possui uma ferramenta que gera um valor de integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN) que fornece uma estimativa da integridade da amostra de RNA.

## **2.6. Purificação do RNA**

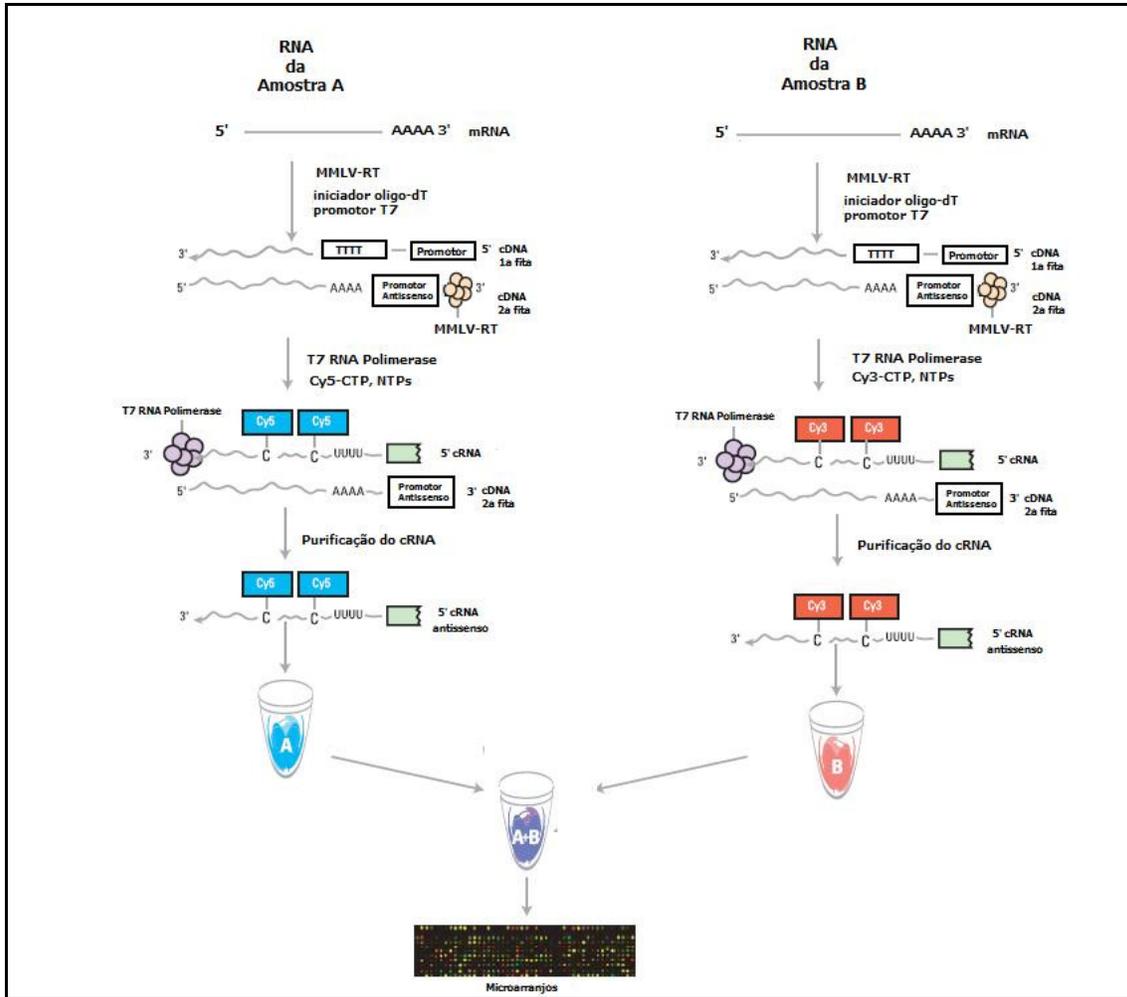
Após a constatação da integridade dos RNAs, as amostras foram purificadas com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) segundo orientações do fabricante. Durante a purificação, também realizamos o tratamento com DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen). A seguir, os RNAs purificados foram novamente quantificados e checados quanto à integridade.

## 2.7. Síntese de cDNA, amplificação e marcação a partir de RNA total

Os procedimentos de preparação e marcação das amostras bem como os referentes ao processamento dos microarranjos foram realizados segundo as orientações do protocolo *Two-color Microarray-Based Gene Expression Analysis* - versão 5.5 (Agilent Technologies).

As reações de amplificação e marcação foram realizadas a partir do kit *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification*. O método usa a T7 RNA polimerase, que simultaneamente amplifica o material alvo e incorpora CTPs marcados com cianina 3 ou cianina 5 (Figura 4).

O monitoramento da sensibilidade, linearidade e precisão das hibridizações foi realizado a partir de controles (*Two Color RNA Spike-In kit*) que contêm RNA de origem vegetal marcado com as cianinas 3-CTP (A) ou 5-CTP (B) em razões pré-determinadas. Cada transcrito é desenhado para hibridizar especificamente com sua respectiva sonda no microarranjo.



**Figura 4.** Esquema do processo de geração de cRNA para um experimento com microarranjos utilizando o sistema “duas cores” (Agilent Technologies).

Como primeiro passo da síntese de cDNA foram adicionados: 2µL dos controles A ou B (de acordo com a marcação a ser realizada para cada amostra), 200ng de RNA total em um volume de 8,3µL e 1,2µL de iniciador oligo-dT ligado ao promotor de T7. Os tubos permaneceram a 65°C por 10 minutos em termociclador e em gelo por 5 minutos. A seguir foram adicionados 8,5µL da mistura para síntese de cDNA (4µL de *5 X First Strand Buffer*, 2µL de 0,01 M de DTT, 1µL de 10mM de dNTP, 1µL de MMLV-RT e 0,5µL de

RNaseOut). Os tubos com a reação final de 20µL foram mantidos em termociclador a 40°C por 2 horas e em 65°C por 15 minutos para a inativação da MMLV-RT.

O desenho experimental deste estudo foi de *dye-swap*, de forma que as amostras de RNA total pré e pós-tratamento foram marcadas em paralelo com as duas cianinas Cy3-CTP (A) e Cy5-CTP (B). Para as reações de transcrição e marcação foi preparada uma mistura de 60µL (15,3µL de H<sub>2</sub>O-DEPC, 20µL de *4X Transcription Buffer*, 6µL de 0,1 DTT, 8µL da mistura NTP, 6,4µL de PEG 50% previamente aquecido por 1 minuto a 40°C, 0,5µL de *RNaseOut*, 0,6µL de pirofosfatase inorgânica, 0,8µL de T7 RNA polimerase e 2,4µL de Cianina 3 ou 5). As amostras foram mantidas em termociclador a 40°C por 2 horas.

A purificação do RNA amplificado e marcado foi realizada novamente com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) segundo as orientações do fabricante.

## 2.8. Hibridização

As hibridizações foram realizadas em duas plataformas distintas. A primeira delas, *Whole Human Genome G4112F 44K Microarray* (Agilent Technologies) contém aproximadamente 40.000 sondas que mapeiam em 19.417 genes únicos anotados e depositados pela Agilent na plataforma GEO (*Gene Expression Omnibus*) com o número de acesso GPL4133. A segunda plataforma é um microarranjo customizado intrônico-exônico com 44.000 elementos desenhado pelo grupo do Dr. Sergio Verjovski-Almeida do Instituto de Química da USP, descrito em Nakaya et al. (87) e impresso pela Agilent. Este microarranjo contém 24.448 sondas para ncRNAs longos (> 200 nt) que mapeiam em

regiões intrônicas de 6.282 *loci* de genes únicos, segundo anotação feita em Dezembro de 2009 pelas coordenadas genômicas do *Human Genome UCSC* (hg17). As sondas são senso e antissenso e representam RNAs longos não codificadores totalmente (TIN) e parcialmente (PIN) intrônicos em relação ao respectivo gene codificador de proteína ou representam lncRNAs que mapeiam em 1.124 regiões intergênicas (87). A anotação para o ncRNA intrônico é aquela do gene codificador de proteína de mesmo *locus*; o ncRNA intergênico é anotado de acordo com o nome do gene codificador mais próximo no cromossomo. Os dados desta plataforma estão depositados no GEO com o número de acesso GPL9193.

Após a purificação foram obtidas as concentrações (ng/ $\mu$ L) das amostras de cRNA marcadas com Cy3-CTP e Cy5-CTP e calculadas as taxas de incorporação das cianinas.

Segundo o desenho experimental do *dye-swap* as amostras (pré e pós-tratamento) de cRNA amplificadas e marcadas foram combinadas e dispostas da seguinte maneira em cada microarranjo:

- 1°. *Array*: pré Cy3 X pós Cy5 - Paciente 1
- 2°. *Array*: pós Cy3 X pré Cy5 - Paciente 1
- 3°. *Array*: pré Cy3 X pós Cy5 - Paciente 2
- 4°. *Array*: pós Cy3 X pré Cy5 - Paciente 2

Primeiramente, as amostras a serem hibridizadas tiveram os volumes ajustados de forma a conter 825 ng de cRNA amplificado e marcado. A seguir, foram adicionados o agente bloqueador e o tampão de fragmentação. Os tubos foram incubados a 60°C por 30

minutos para ocorrer a fragmentação do cRNA. Esse procedimento é importante para evitar que as estruturas secundárias e terciárias dos cRNAs reduzam a eficiência do processo de hibridização. Após a fragmentação, o tampão de hibridização foi adicionado. Em seguida foi realizada a etapa de aplicação das amostras nas lâminas segundo as orientações do protocolo. A hibridização ocorreu a 65°C por 17 horas.

As lavagens foram feitas com as soluções *Wash Solution I*, *Wash Solution II* e *Agilent Stabilization and Drying Solution III* também seguindo as recomendações do protocolo. As lâminas foram escaneadas pelo equipamento *Gene Pix 4000B* (Molecular Devices) e os dados extraídos pelo *Agilent Feature Extraction Software* (Agilent).

## **2.9. Análise dos Dados e Normalização**

O programa *Agilent Feature Extraction Software 9.5.1.1* foi utilizado para a extração dos valores de intensidade de fluorescência. O programa localiza a região de cada sonda e extrai somente a intensidade de cada *spot*, subtraindo os sinais de fundo local (ao redor dos *spots*).

Em seguida realizamos a filtragem dos *spots* considerados “apagados”, isto é, *spots* cujos níveis de intensidade são oriundos de hibridização inespecífica. O critério utilizado foi o *flag* produzido pelo programa descrito no início desta seção. Este *flag* é obtido a partir de um teste t que identifica quais valores de intensidade estão significativamente ( $p < 0,05$ ) acima dos valores de fundo local.

A normalização foi realizada pelo método quantil (94) disponível no pacote *Affy* na linguagem estatística R, parte do projeto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). A normalização é um método que corrige os erros sistemáticos inerentes à própria tecnologia de microarranjos, como diferenças na eficiência da marcação e nas propriedades de escaneamento de Cy3 e Cy5. Para a normalização por quantil, os valores de intensidade brutos de cada lâmina (no nosso caso de cada *array*) são ordenados de forma crescente, e para cada transcrito é dada uma etiqueta de identificação. A seguir é realizada a média dos valores de intensidade para cada posição no *ranking*. Os valores médios substituem todos os valores absolutos de cada uma das lâminas que corresponderem àquela posição no *ranking*. Por fim ocorre uma nova ordenação e os valores médios de intensidade correspondentes a cada transcrito são reorganizados de acordo com a identificação inicial.

A precisão das medidas de expressão foi verificada pelo coeficiente de correlação entre os dados brutos e também entre os dados normalizados por quantil das lâminas utilizadas em cada subgrupo de análise.

## **2.10. Análise de significância estatística**

Essa análise foi realizada pela ferramenta *SAM* (*Significance Analysis of Microarrays*). *SAM* é um método estatístico especificamente desenhado para a identificação de diferenças em perfis de expressão gênica baseados na tecnologia de microarranjos em larga escala. Para cada gene é estabelecido um valor estatístico que mede a força da relação entre a expressão gênica e a variável resposta (como exemplo responsivo e não responsivo). Várias permutações dos dados são realizadas para determinar se a

expressão dos genes está significativamente relacionada ao tipo de resposta. Para cada valor de FDR (*False Discovery Rate*) há um parâmetro correspondente denominado delta que estabelece quantos genes dentro desse limite são diferencialmente expressos (95). A seguir aplicamos a análise *Leave-One-Out-Cross-Validation* (LOOCV) (96) com o intuito de tornar mais robustas as assinaturas de expressão gênica. As análises SAM são repetidas o número de vezes de amostras do estudo, de forma que em cada nova repetição uma das amostras é retirada e uma nova lista de transcritos diferencialmente expressos é obtida. O perfil de expressão gênica final é então formado pelos transcritos presentes em 100% das listas. Dessa maneira, é possível minimizar o efeito individual que cada amostra representa na análise e ordenar os genes pela sua frequência de aparecimento nos vários grupos.

Amostras de pacientes responsivos (R) e de pacientes não responsivos (NR) ao tratamento com IM e dasatinibe foram comparadas em três diferentes combinações (subgrupos) para identificação de genes diferencialmente expressos. Subgrupo 1: amostras pré-tratamento de R versus amostras pré-tratamento de NR. Subgrupo 2: amostras pré-tratamento de R versus amostras pós-tratamento de NR. Subgrupo 3: amostras pré-tratamento de NR versus amostras pós-tratamento de NR.

A normalização por *Z-score* e os mapas de expressão (*Heat Maps*) foram feitos a partir do programa *Spotfire DecisionSite* 9.1.2 (TIBCO).

Os transcritos diferencialmente expressos entre as amostras dos subgrupos foram submetidos ao programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), versão 9.0 (Ingenuity® Systems) para a identificação das funções biológicas e para o mapeamento de redes gênicas e vias canônicas significativamente enriquecidas.

## *Resultados*

---



## **1. Pesquisa de mutações no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* em pacientes resistentes ao tratamento com TKIs**

### **1.1. Pacientes**

As amostras de sangue periférico para a pesquisa de mutações no gene *BCR-ABL* foram coletadas de 71 pacientes com diagnóstico de LMC resistentes ao tratamento com IM, dasatinibe ou nilotinibe e acompanhados pelo Hemocentro da UNICAMP.

### **1.2. Pesquisa de mutações no domínio quinásico *BCR-ABL***

Dos 71 pacientes deste estudo, 50 tiveram amostras coletadas para pesquisa de mutações durante o tratamento com IM e 20 após o término do IM (6 em FA ou CB, 1 paciente em FC com perda de resposta hematológica, 1 paciente em FC sem resposta citogenética, 11 com falha hematológica ou citogenética ao dasatinibe ou nilotinibe e 1 com resposta subótima ao dasatinibe). Um paciente incluído neste grupo não foi tratado com IM, tendo feito uso de nilotinibe como primeira linha. Na data da coleta para pesquisa de mutação este paciente apresentava falha de resposta com dasatinibe (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** Dados clínicos de pacientes com pesquisa de mutações de ponto no domínio quinásico *BCR-ABL* durante o uso de IM.

Paciente n.	Sexo	Idade ao diag.	Fase da doença início do IM	Primeira linha IM	Evolução clonal	Tipo de mutação	Tempo de uso de IM na pesquisa da mut (meses)	Uso de TKI - segunda geração	Acompanhamento após mut (meses)	Situação na última avaliação/tratamento
1	F	5	FCT	não	não	F359V	27	D/N	109	óbito/-
2	M	56	FA	não	não	T315I	5	D	31	óbito/-
3	M	63	FCT	não	não	F317L	18	D/N	97	vivo/N
4	F	27	FA	não	+der(22)	L248V	20	não	2	óbito/-
5	F	54	FCP	sim	não	G250E	7	não	2	óbito/-
6	M	33	FA	não	não	T315I	28	D	60	óbito/-
7	M	63	FA	não	não	Y253H	7	D	82	vivo/D
8	F	31	FCP	sim	não	F359V	38	não	3	vivo/pós-aloTCTH
9	F	45	FCP	sim	não	M244V	7	não	7	óbito/-
10	M	45	FCT	não	não	E255V	31	D/N	42	vivo/D
11	M	48	FA	não	não	M351T	64	D/N	54	óbito/-
12	M	54	FCT	não	não	G250E+Y253H	42	D/N	60	vivo/HU
13	M	50	CB	não	não	M244V	pré-trat	não	2	óbito/-
14	M	59	FCP	sim	não	T315I	18	não	55	vivo/HU
15	M	37	FCP	sim	não	M244V	23	N	54	vivo/D
16	M	31	FCT	não	não	E255K	6	não	11	óbito/-
17	F	55	FA	não	não	M351T+T315I	8	D	4	óbito/-
18	F	26	CB	não	não	E255K	1	não	4	óbito/-
19	M	32	FCP	sim	não	L387M	18	D	16	vivo/D
20	M	80	CB	não	não	M244V	32	D	16	óbito/-
21	M	48	FA	não	não	ND	22	não	5	óbito/-
22	M	28	CB	não	t(8;16;18)	ND	pré-trat	não	99	vivo/IM
23	M	45	FA	não	não	ND	pré-trat	não	5	vivo/pós aloTCTH
24	F	50	FCT	não	não	ND	7	D	10	óbito/-

Paciente n.	Sexo	Ida de ao diag	Fase da doença início do IM	Primeira linha IM	Evolução clonal	Tipo de mutação	Tempo de uso de IM na pesquisa da mut (meses)	Uso de TKI - segunda geração	Acompanha-mento após mut (meses)	Situação na última avaliação/tratamento	Tipo de Resposta
25	M	51	FCP	não	+der(22)	ND	6	não	13	óbito/-	-
26	M	27	CB	não	não	ND	3	não	6	óbito/-	-
27	M	27	FCT	não	não	ND	22	não	18	óbito/-	-
28	F	28	FCP	não	não	ND	22	D/N	57	óbito/-	-
29	M	28	FCP	sim	+8	ND	13	não	18	vivo/pós aloTCTH	DND
30	F	46	FCT	não	não	ND	45	D/N	62	vivo/N	RH
31	M	57	FCT	não	não	ND	33	N	57	vivo/N	RMM
32	M	35	FA	não	não	ND	pré-trat	não	4	vivo/pós aloTCTH	DND
33	M	35	FCP	sim	não	ND	8	D	57	vivo/D	RCC
34	F	37	FCP	não	não	ND	29	não	55	vivo/IM	RCC
35	F	50	FCT	não	não	ND	18	D/N	50	vivo/HU	RH
36	F	44	FCP	sim	não	ND	20	não	53	vivo/IM	RCC
37	F	68	FCP	sim	não	ND	16	não	54	vivo/IM	RMM
38	M	50	FCP	sim	não	ND	31	não	55	vivo/IM	RMM
39	M	46	FCP	sim	não	ND	18	não	52	vivo/IM	RMM
40	M	42	CB	não	não	ND	5	não	2	óbito/-	-
41	F	39	FA	não	não	ND	13	D	8	vivo/pós-alotCTH	RCM
42	M	43	FA	não	não	ND	23	D	18	vivo/D	RMM
43	M	21	FCP	sim	Ph+ extra	ND	11	D	20	vivo/D	RCC
44	F	38	FCP	sim	não	ND	45	não	32	vivo/IM	RCC
45	M	22	FA	não	não	ND	8	sim	24	vivo/N	RMM
46	M	65	FCP	sim	não	ND	15	N	15	vivo/N	RMM
47	F	49	FCT	não	não	ND	8	não	26	vivo/IM	RMM
48	M	67	FCT	não	-Y	ND	57	D	27	vivo/D	RH
49	M	57	FCP	sim	não	ND	6	D	44	vivo/D	RMM
50	F	67	FCP	sim	não	ND	36	não	16	vivo/IM	RCC

M: masculino; F: feminino; FCP: Fase Crônica Precoce; FCT: Fase Crônica Tardia; FA: Fase Acelerada; CB: Crise Blástica; Ph+: cromossomo Philadelphia; ND: não detectado; HU:

hidroxiuréia; IM: mesilato de imatinibe; D: dasatinibe; N: nilotinibe; aloTCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico; FC: Fase Crônica; RCC: Resposta Citogenética

Completa; RMM: Resposta Molecular Maior; DND: dado não disponível.

**Tabela 4.** Dados clínicos de pacientes com pesquisa de mutações de ponto no domínio quinásico BCR-ABL após o uso de IM.

Paciente n.	Sexo	Idade ao diag.	Fase da doença início do IM	Primeira linha IM	Evolução clonal	Tipo de mutação	Tratamento no momento da detecção da mut (meses)	Uso de TKI - segunda geração	Acompanhamento após mut (meses)	Situação na última avaliação/tratamento	Tipo de Resposta
51	M	37	CB	não	não	E279K	QT	não	4	óbito/ -	-
52	M	64	FCP	sim	não	T315I	D	D	12	óbito/ -	-
53	M	54	FA	não	não	T315I	QT	D	12	óbito/ -	-
54	F	53	FA	não	não	M244V	D	D/N	84	óbito/ -	-
55	M	60	FCP	não	não	T315I	D	D	7	vivo/pós-TCTH	DND
56	F	14	FA	não	não	E255K	D	D	53	vivo/D	RCC
57	M	55	FCT	não	não	ND	N	D/N	23	vivo/N	RH
58	M	43	FCT	não	não	ND	HU	D/N	86	vivo/pós-aloTCTH	FC
59	M	32	FCP	sim	Ph+ extra	ND	IM	D		vivo/HU	CB
60	F	35	FCP	sim	não	ND	N	D/N	29	vivo/D	RH
61	F	61	FCT	não	não	ND	D	N	39	vivo/N	RH
62	M	21	FA	não	não	ND	N	D/N	39	vivo/N	RH
63	M	48	FCT	não	não	ND	D	D/N	41	vivo/N	RH
64	F	72	FCP	sim	não	ND	sem	D/N	23	vivo/N	RH
65	F	35	FCP	sim	não	ND	IM	N		vivo/N	RH
66	M	62	FCT	não	i(17), Ph+ extra	ND	HU	D	7	óbito/ -	-
67	M	54	FCT	não	não	ND	HU	D	21	óbito/ -	-
68	F	44	FA	não	não	ND	D	D	28	vivo/HU	FC
69	F	30	FA	não	não	ND	D	D	2	vivo/pós-aloTCTH	DND
70	M	18	CB	não	Ph+ extra/ +9 / +Y	ND	sem	D	20	vivo/quimioterapia	DND
71	M	36	FC	-	não	ND	D	D/N	8	óbito/ -	-

M: masculino; F: feminino; FC: Fase Crônica; FA: Fase Acelerada; CB: Crise Blástica; Ph+: cromossomo Philadelphia; DND: dado não disponível; ND: não detectado; QT: quimioterapia; D: dasatinibe; N: nilotinibe; HU: hidroxiuréia; IM: mesilato de imatinibe; aloTCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico; RH: resposta hematológica; RCC: Resposta Citogenética Completa

### 1.2.1. A partir da data de coleta da pesquisa de mutações

No primeiro bloco de análises, foram incluídos todos os pacientes (n = 71), sendo 45 homens e 26 mulheres, com uma mediana de idade de 45 anos (5-80) ao diagnóstico e 50 anos (19-81) no momento da coleta da amostra. A mediana do intervalo de tempo entre o diagnóstico e a pesquisa de mutação foi 31 meses (0-208).

A maioria dos pacientes incluídos neste bloco de análises foi avaliada durante o tratamento com IM (n = 50). Em relação à fase da doença no início do tratamento, mutações foram observadas em 6/20 (30%) dos pacientes em FCP, 5/12 (42%) dos pacientes em FCT, 6/12 (50%) dos pacientes em FA e 3/6 (50%) dos pacientes em CB. Para os pacientes que tiveram amostras coletadas após a suspensão do IM (n = 20), mutações foram detectadas em 3/6 (50%) pacientes em FA ou CB, 0/2 (0%) pacientes em FC, 2/11 (18%) pacientes que apresentaram falha hematológica ou citogenética com dasatinibe ou nilotinibe e 1/1 paciente com resposta subótima ao dasatinibe. O paciente que fez uso de nilotinibe como primeira linha, foi avaliado durante o tratamento com dasatinibe, mas não apresentou mutações.

Dos 71 pacientes, 26 (37%) tiveram 28 mutações detectadas no domínio quinásico *BCR-ABL* mapeando em 12 resíduos diferentes. As mutações encontradas com maior frequência foram T315I (7/28, 25%), M244V (5/28, 18%) e E255K/V (4/28, 14%). Dois pacientes tiveram duas mutações identificadas em uma mesma amostra; o caso 12, as mutações G250E e Y253H e o caso 17, M351T e T315I.

Oito pacientes (30%) tiveram 9 mutações identificadas na região *P-loop*, [L248V (n = 1), G250E (n = 1), Y253H (n = 1), E255K (n = 3), E255V (n = 1) e G250E/Y253H (n =

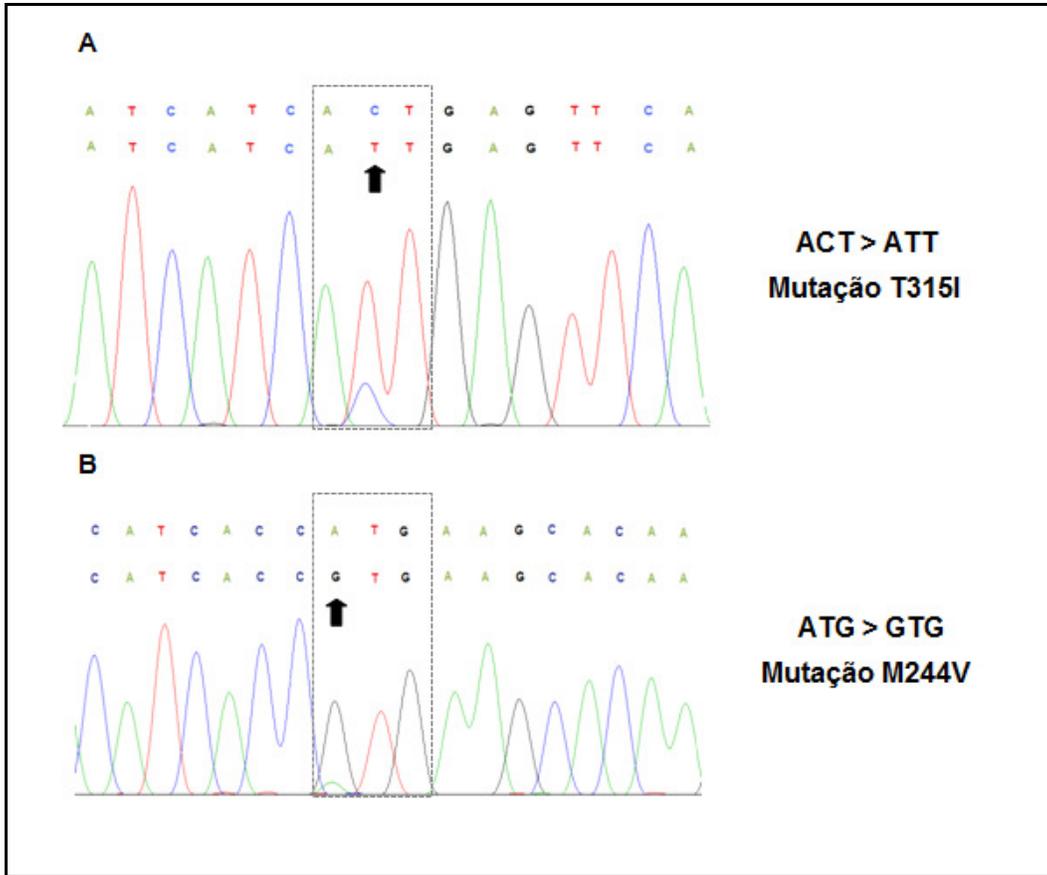
1)] (Tabela 3). Quatro pacientes que estavam em CB no momento da coleta foram a óbito, dois durante o tratamento (casos 4 e 5) e dois após a suspensão do IM (casos 16 e 18).

O caso 10 teve a mutação E255V identificada durante a perda de resposta hematológica aos 31 meses de uso de IM. Em seguida, o paciente fez uso de nilotinibe e apresentou resistência após 3 meses de tratamento. Aos 11 meses com dasatinibe o paciente estava com RH, porém houve perda do seguimento. O caso 12 teve a mutação Y253H identificada após 27 meses de uso de IM e uma segunda mutação, G250E, foi identificada aos 41 meses. Este paciente apresentou falha de resposta e após a suspensão do IM, fez uso de nilotinibe e em seguida de dasatinibe, sendo também resistente aos dois tratamentos. Atualmente está em tratamento com HU. O caso 7 apresentou a mutação Y253H após 7 meses de tratamento com IM durante progressão para FA. Após suspensão do IM, permanece em uso com dasatinibe, apresentando RH, com tempo de seguimento de 82 meses. O caso 56 foi tratado com IM por 40 meses e aos 30 meses de tratamento com dasatinibe teve a mutação E255K identificada, durante resposta subótima. Atualmente mantém dasatinibe e está em RCC.

Neste estudo, a mutação T315I foi identificada em 7 pacientes, sendo três deles com perda de resposta hematológica durante IM. O caso 2 (Figura 5A) iniciou IM em FA e teve a mutação identificada aos 5 meses de tratamento. Este paciente foi tratado com dasatinibe por 12 meses, mas foi a óbito após 3 meses da suspensão da terapia por progressão. O caso 6 também iniciou IM em FA e teve a mutação T315I identificada aos 28 meses de tratamento. Este paciente realizou tratamento quimioterápico após resistência ao dasatinibe, mas foi a óbito em FA após 60 meses da detecção da mutação. O caso 14 teve a mutação identificada aos 18 meses com IM. Este paciente não foi tratado com TKI de

segunda geração e atualmente está em uso de HU. Quatro pacientes tiveram a pesquisa realizada após suspensão do IM, sendo os casos 17, 52 e 55 durante dasatinibe e o caso 53 durante tratamento quimioterápico. O caso 17 teve a mutação M351T detectada aos 8 meses de tratamento com IM quando progrediu para CB. Após 3 meses de tratamento com dasatinibe, a mutação T315I foi detectada simultaneamente com a M351T e este paciente foi a óbito. O caso 52 fez uso de dasatinibe por 6 meses, apresentou resistência e após 8 meses progrediu para CB e foi a óbito. O caso 55 foi tratado com dasatinibe por 14 meses, apresentou falha do tratamento e foi submetido ao TCTH. O caso 53 teve a mutação identificada após 11 meses da suspensão do IM. Este paciente iniciou tratamento com dasatinibe, mas foi a óbito aos 4 meses de tratamento.

A mutação M244V foi identificada em 5 pacientes. O caso 9 teve a mutação identificada durante a transformação para FA e foi a óbito. O caso 15 (Figura 5B) teve perda de RCM durante IM, foi tratado com nilotinibe por 15 meses e apresentou resistência. Após 32 meses de tratamento com dasatinibe apresenta RCM. O caso 13 teve a mutação detectada ao iniciar o tratamento com IM em CB e após dois meses foi a óbito. O caso 20 fez uso de IM por 18 meses, foi tratado com dasatinibe por um mês, mas progrediu para FA e foi a óbito. O caso 54 foi tratado com IM por 35 meses, apresentou resistência com evolução para CB, tendo usado quimioterápicos e teve a mutação detectada ao iniciar o dasatinibe em FA. Obteve resposta hematológica com uso de dasatinibe e após 46 meses apresentou resistência, não respondendo também ao nilotinibe. Este paciente foi a óbito 31 meses após a suspensão dos TKIs por progressão da doença, sendo tratado com cuidados paliativos (HU e transfusão).



**Figura 5.** As duas mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* mais frequentes encontradas em pacientes resistentes ao tratamento com IM neste estudo. (A) Caso 2 com a mutação T315I. (B) Caso 15 com a mutação M244V. Setas indicam o nucleotídeo mutado e as caixas os resíduos afetados.

O caso 51 teve a mutação E279K detectada após 4 meses da suspensão do IM durante CB e tratamento quimioterápico. Este paciente foi a óbito após 4 meses da detecção da mutação.

O caso 11 iniciou IM em FA e teve a mutação M351T identificada aos 64 meses de tratamento. Após dois meses de uso de nilotinibe, o paciente apresentou toxicidade

cardíaca grave e o tratamento foi suspenso. Com dasatinibe foi tratado por 8 meses, mas apresentou resistência. Este paciente foi a óbito por infarto após 27 meses do final da terapia com dasatinibe.

Os casos 1 e 8 tiveram a mutação F359V detectada após perda de resposta hematológica com IM e foram submetidos ao TCTH. O caso 1, após mini TCTH foi tratado com dasatinibe por 48 meses, seguido por nilotinibe por 8 meses, sem resposta. O paciente foi submetido a um segundo transplante aparentado alogênico, obtendo RMM, mas foi a óbito por complicações relacionadas ao transplante. No último seguimento, o caso 8 apresentava RMM após aloTCTH.

O caso 3 teve falha de resposta com IM e a mutação F317L foi identificada aos 18 meses de tratamento. Em seguida fez uso de dasatinibe por 12 meses até apresentar intolerância à droga. Este paciente está em RCC após 50 meses de tratamento com nilotinibe.

Mutações não foram encontradas em 30 casos resistentes com pesquisa de mutação realizada durante o tratamento com IM. Dos 30 pacientes, 7 foram a óbito, 9 permanecem até o momento usando IM (sendo um apresentando RH, quatro RCC e quatro RMM). Nove pacientes estão sendo tratados com dasatinibe ou nilotinibe (atualmente dois apresentam RH, dois RCC e cinco RMM). Quatro pacientes foram submetidos ao aloTCTH após IM e um paciente está sendo tratado com HU e está com RH.

Dos 14 pacientes que tiveram pesquisa realizada após IM e que não apresentaram mutações, 2 foram a óbito após uso de dasatinibe e/ou nilotinibe. Atualmente 6 pacientes estão em tratamento com nilotinibe e apresentam RH. Dois estão fazendo uso de

dasatinibe, um com RH e outro com RCC. Dois foram submetidos ao aloTCTH e 2 estão em tratamento com HU. Apenas um caso avaliado não foi tratado com IM. Este paciente iniciou nilotinibe em primeira linha em FC, mas progrediu para CB aos 2 meses de tratamento. Em seguida fez uso de dasatinibe, mas foi a óbito aos 16 meses de terapia.

Nove pacientes apresentaram evolução clonal citogenética, somente um com mutação identificada (caso 4). Os casos 4, 22, 25, 29, 43, 48 e 66 tiveram as alterações identificadas durante o uso de IM. Com relação aos pacientes sem mutação, o caso 22 não apresentou progressão da doença e mantém IM em RH; os casos 25 e 43 tiveram as alterações citogenéticas identificadas durante progressão para FA, o caso 25 foi a óbito 5 meses após a progressão e o caso 43 está atualmente em tratamento com dasatinibe com RCC; o caso 29 foi submetido ao aloTCTH; os casos 48 e 66 progrediram após o fim do IM, sendo que o caso 48 está atualmente em tratamento com dasatinibe com RH e o caso 66 foi a óbito após 7 meses da progressão. O caso 59 teve as alterações identificadas durante o uso de dasatinibe e atualmente está em CB; o caso 70 apresentou as alterações após resistência ao IM em CB, obteve RCC com dasatinibe e posteriormente perdeu resposta com nova progressão para CB. Atualmente está em tratamento com quimioterapia.

#### 1.2.1.1. Características dos pacientes *versus* presença de mutações

Idade ao diagnóstico ( $p = 0,63$ ), idade na pesquisa de mutação ( $p = 0,40$ ), tempo entre diagnóstico e início do IM ( $p = 0,66$ ), baço ( $p = 0,86$ ), hemoglobina ( $p = 0,82$ ), leucócitos totais ( $p = 0,16$ ), plaquetas ( $p = 0,45$ ), basófilos ( $p = 0,52$ ), promielócitos ( $p =$

0,90), blastos sangue periférico ( $p = 0,53$ ), blastos medula óssea ( $p = 0,25$ ) não mostraram significância estatística entre pacientes com ou sem mutações.

Entre as características dos pacientes associadas à presença de mutações, progressão para FA/CB e/ou óbito foram observados em 16/26 (61%) dos pacientes com mutação e em 13/45 (29%) dos pacientes sem mutação ( $p = 0,01$ ).

Após o tempo mediano de seguimento de 29 meses (2-109), 16/26 (61%) dos pacientes com mutação e 10/45 (22%) dos pacientes sem mutação foram a óbito ( $p = 0,002$ ), enquanto 17/26 (65%) dos pacientes com mutação e 14/45 (31%) dos pacientes sem mutação tiveram a ocorrência de eventos ( $p = 0,02$ ).

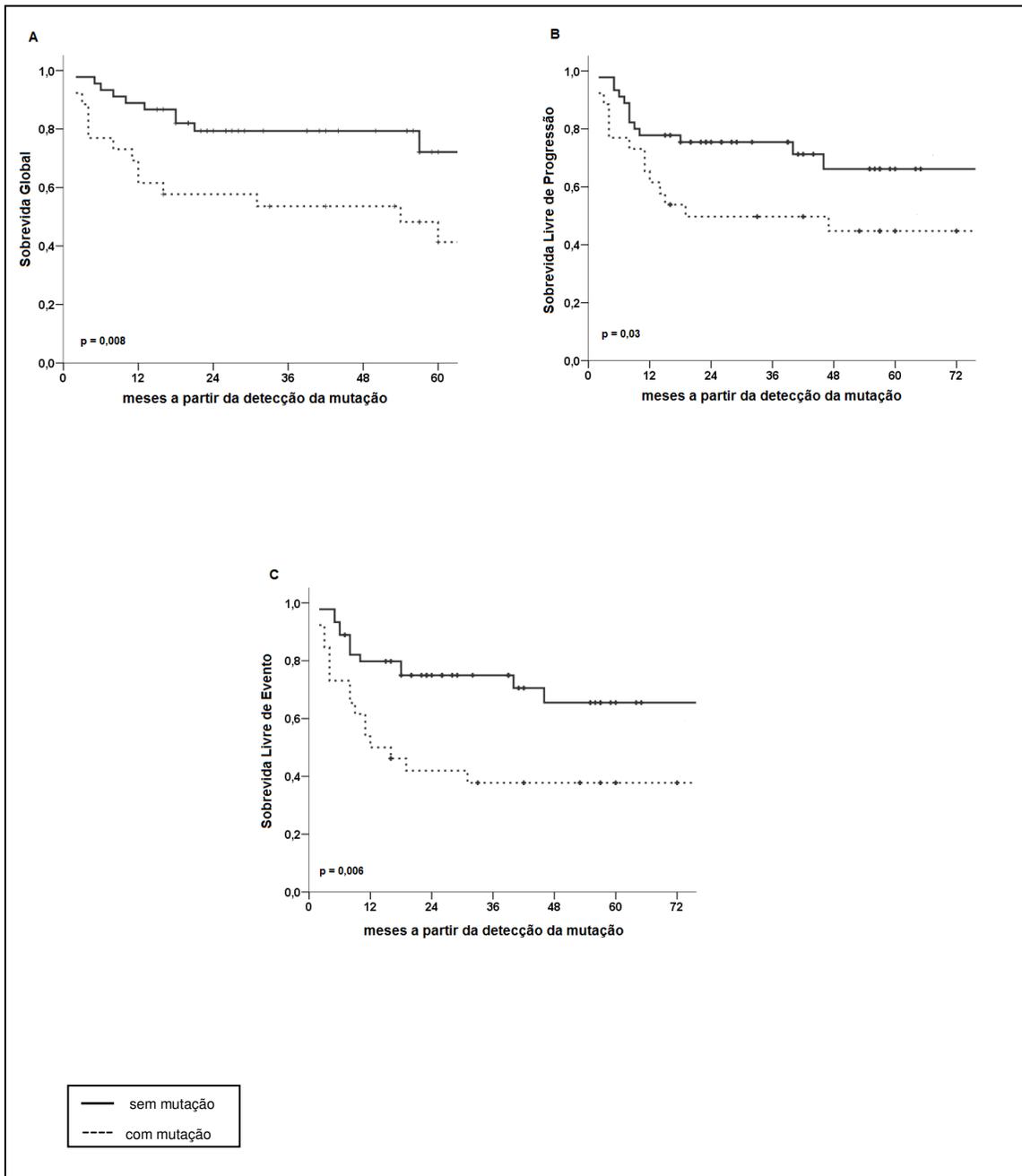
#### 1.2.1.2. Análises de sobrevida

Na análise de sobrevida a partir da data da coleta da pesquisa de mutações, a taxa de SG dos pacientes foi de 71% e 58% aos 24 meses e 60 meses de seguimento, respectivamente. A taxa de SG dos pacientes com mutações foi menor (41%) em relação aos pacientes sem mutações (72%) ( $p = 0,008$ ) (Figura 6A). Diferença significativa também foi encontrada na taxa de SG dos pacientes classificados de acordo com a fase da doença no momento da pesquisa de mutações, sendo maior para os pacientes em FA (87%), seguida pelos pacientes em FC (72%) e em CB (11%) ( $p < 0,0001$ ).

As taxas de SLP foram de 66% e 58% aos 24 e 60 meses, respectivamente. A taxa de SLP dos pacientes com mutações foi menor (44%) em relação aos pacientes sem mutações (66%) ( $p = 0,03$ ) (Figura 6B). Ainda, pacientes em FC e FA no momento da

pesquisa de mutações apresentaram a mesma taxa de SLP (75%), superior a dos pacientes em CB (11%) ( $p < 0,0001$ ).

As taxas de SLE foram de 63% e 55% aos 24 e 60 meses, respectivamente. A SLE dos pacientes com mutações também foi menor (37%) em relação aos pacientes sem mutações (65%) ( $p = 0,006$ ) (Figura 6C). Ainda, pacientes em FC e FA no momento da pesquisa de mutações apresentaram taxas similares de SLP, 70% e 75%, respectivamente, em relação a pacientes em CB (11%) ( $p < 0,0001$ ).

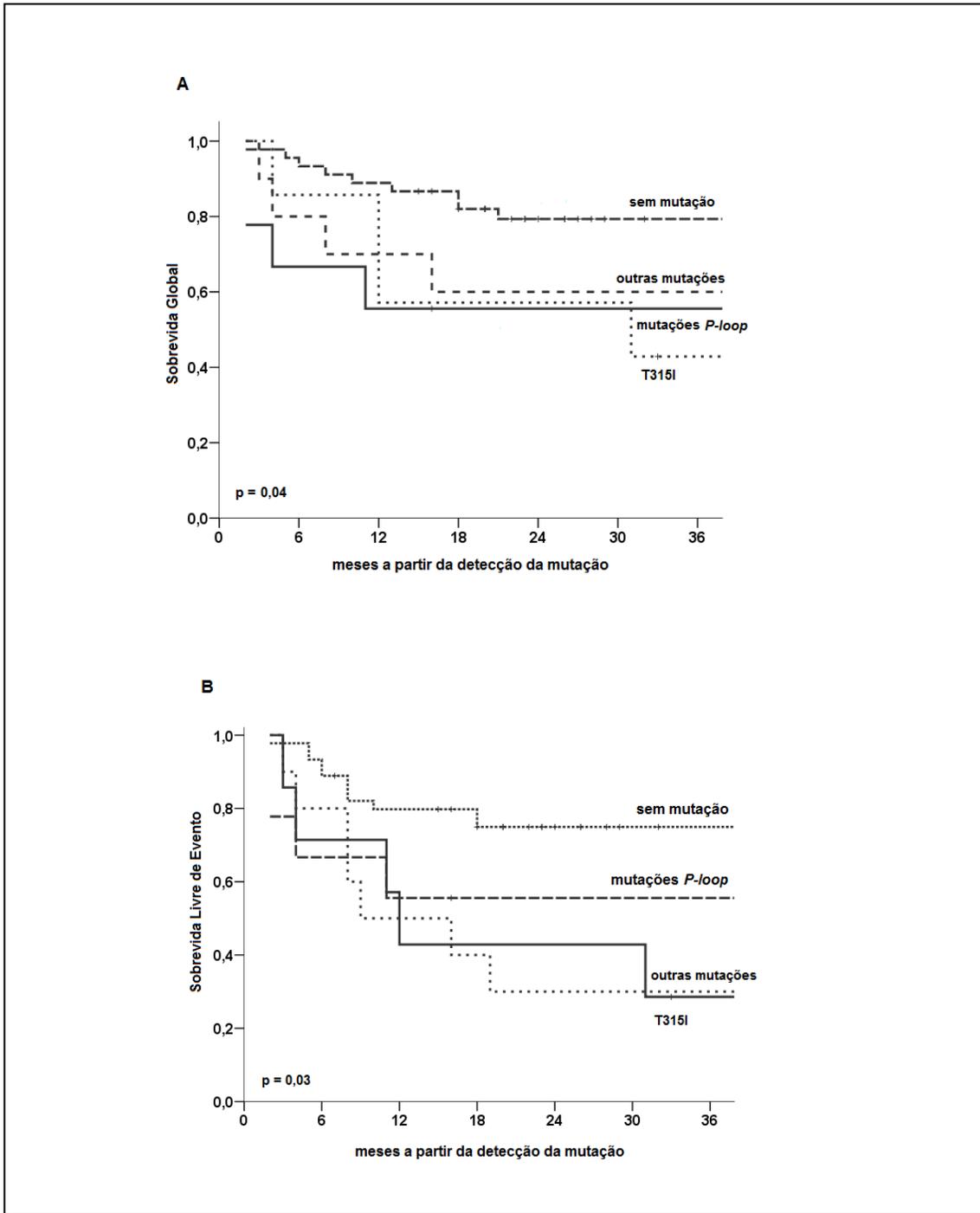


**Figura 6.** Análises de sobrevida de pacientes com mutação *versus* pacientes sem mutação. As análises de (A) SG, (B) SLP e (C) SLE foram realizadas a partir da data da coleta para pesquisa de mutação e mostram diferenças significativas entre pacientes com mutações e sem mutações. O método Kaplan-Meier e teste log-rank foram utilizados.

A regressão de riscos proporcionais de Cox univariada apontou que a presença de mutações ( $p = 0,01$ , razão de risco (HR) = 2,83, 95% de intervalo de confiança (CI): 1,26 - 6,34), ausência de FC no momento da pesquisa de mutações ( $p < 0,0001$ , HR = 6,36, 95% CI: 2,7 - 14,9) e falha em atingir RHC ( $p = 0,001$ , HR = 3,79, 95% CI: 1,68 - 8,55) foram associadas a uma pior SG. Todas estas variáveis também foram associadas a uma pior SLE, presença de mutações ( $p = 0,009$ , HR = 2,57, 95% CI: 1,26 - 5,23), ausência de FC no momento da pesquisa de mutações ( $p < 0,0001$ , HR = 4,02, 95% CI: 1,92 - 8,41) e falha em atingir RHC ( $p = 0,02$ , HR = 2,37, 95% CI: 1,1 - 5,1), somada pela porcentagem de blastos presentes na medula óssea ( $p = 0,01$ , HR = 1,04, 95% CI: 1,01 - 1,08) e tempo de tratamento até a detecção da mutação ( $p = 0,04$ , HR = 0,98, 95% CI: 0,96 - 1,00).

Na análise multivariada, a presença de mutações ( $p = 0,002$ , HR = 3,76, 95% CI: 1,63 - 8,63) e ausência de FC ( $p < 0,0001$ , HR = 7,88, 95% CI: 3,26 - 19,0) foram associadas a uma pior SG. As mesmas variáveis, presença de mutações ( $p = 0,003$ , HR = 3,02, 95% CI: 1,46 - 6,23) e ausência de FC ( $p < 0,0001$ , HR = 4,51, 95% CI: 2,14 - 9,48), tiveram impacto negativo na SLE.

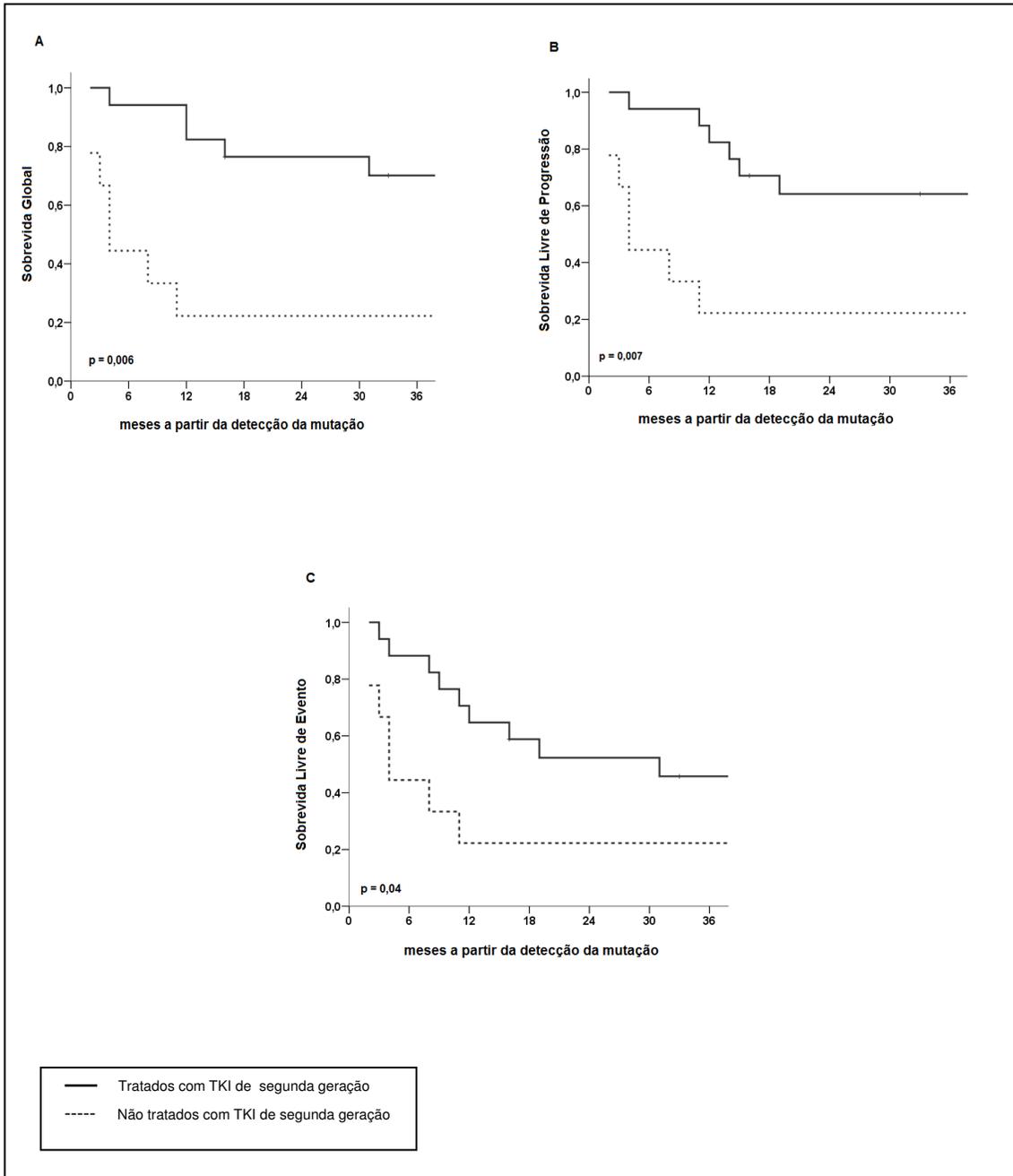
Uma menor taxa de SG foi observada para os pacientes com a mutação T315I (43%) comparada às taxas dos pacientes com mutações localizadas na região *P-loop* (55%) e dos pacientes com outras mutações (60%) ( $p = 0,04$ ) (Figura 7A). A taxa de SLE foi menor para os pacientes com a mutação T315I (28%) comparada às taxas dos pacientes com outras mutações (30%) e dos pacientes com mutações na região *P-loop* (55%) ( $p = 0,03$ ) (Figura 7B). A análise de SLP não obteve significância estatística ( $p = 0,15$ ).



**Figura 7.** Análises de sobrevida a partir do *status* mutacional. As análises de (A) SG e (B) SLE foram realizadas a partir da data da coleta para pesquisa de mutação e mostram diferenças significativas em função do *status* mutacional dos pacientes. O método Kaplan-Meier e teste log-rank foram utilizados.

Após resistência ao IM, 45 pacientes receberam dasatinibe e/ou nilotinibe. Um caso foi tratado com nilotinibe em primeira linha. Não houve diferença significativa entre os pacientes que foram tratados (n = 46) ou não tratados (n = 25) com dasatinibe e/ou nilotinibe com relação à SG (p = 0,16), SLP (p = 0,39) e SLE (p = 0,59).

Quando considerados somente os casos que tiveram mutações detectadas, as taxas de SG (p = 0,006), SLP (p = 0,007) e SLE (p = 0,04) foram maiores para os pacientes tratados (n = 17) em relação aos pacientes não tratados (n = 9) com TKIs de segunda geração (Figura 8).



**Figura 8.** Análises de sobrevida de pacientes com mutações que fizeram uso de TKI de segunda geração. As análises de (A) SG, (B) SLP e (C) SLE foram realizadas a partir da data da coleta para pesquisa de mutação e mostram diferenças significativas entre pacientes com mutações que foram ou não tratados com TKIs de segunda geração. O método Kaplan-Meier e teste log-rank foram utilizados.

### **1.2.2. Durante o tratamento com IM**

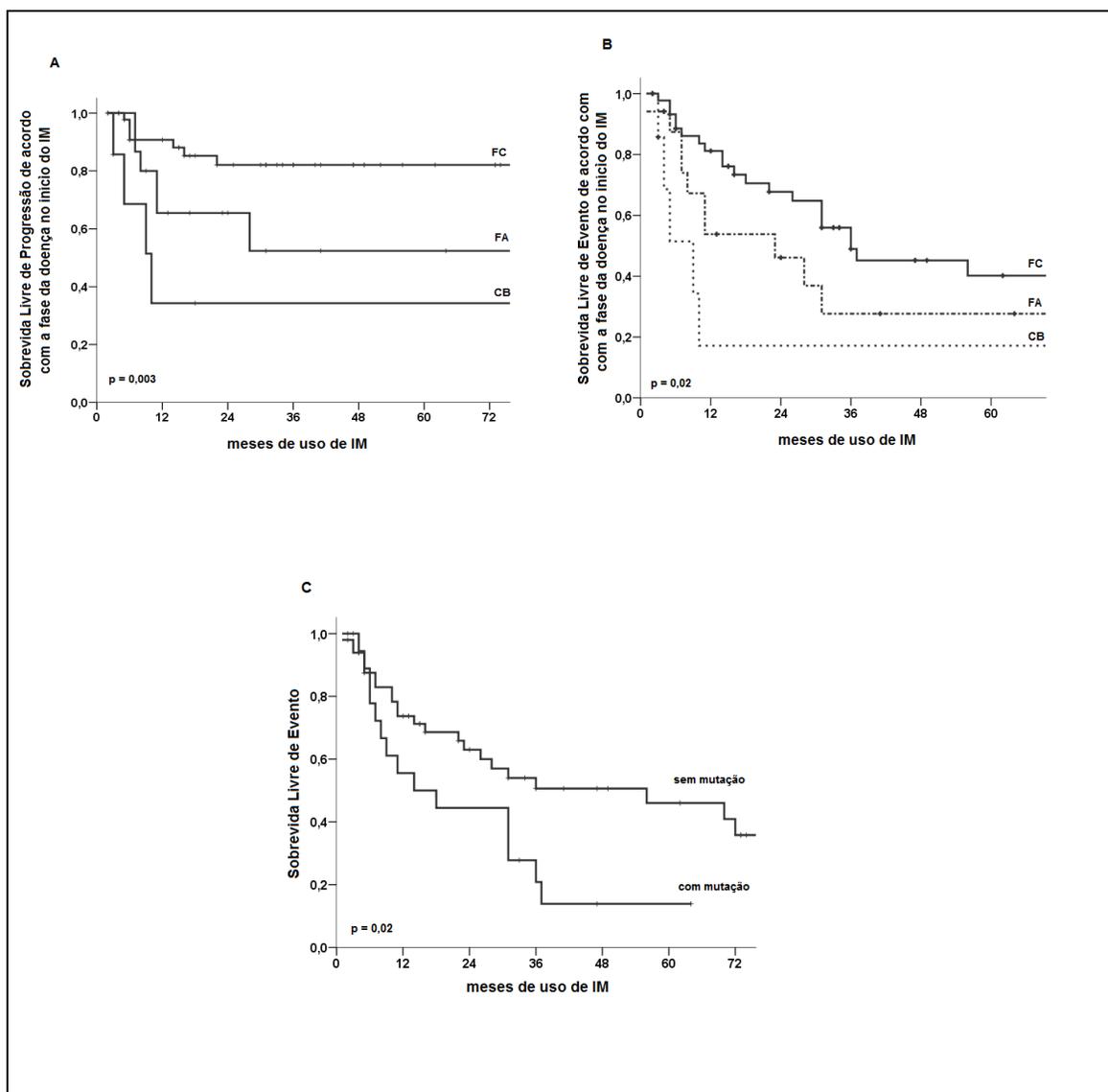
No segundo bloco de análises foi avaliado o grupo de pacientes (n = 70) durante o período de tratamento com IM.

A idade mediana no início do tratamento foi de 45 anos (21-80). A mediana do tempo entre diagnóstico e início do tratamento foi de 6 meses (0-310). Com relação à fase da doença no início do tratamento com IM, 26/70 (37%) dos pacientes estavam em FCP, 18/70 (26%) em FCT, 18/70 (26%) em FA e 8/70 (11%) em CB. Dos 70 pacientes, 23 foram previamente tratados com IFN- $\alpha$  e 22 receberam IM em primeira linha.

Após um tempo mediano de tratamento de 23 meses (1-97), 9 pacientes permanecem com IM. As causas de descontinuidade foram resistência (65%), óbito (12%), TCTH (8%), intolerância (12%) e abandono de tratamento (3%).

As análises de SG, SLP e SLE foram realizadas considerando o período entre o início e o fim do tratamento com IM dos 70 pacientes. Assim, as taxas de SG foram de 92% e 85%, enquanto as taxas de SLP de 73% e 70%, respectivamente, aos 24 e 60 meses. Não houve diferenças significativas nas taxas de SG e SLP entre pacientes com ou sem mutações durante o tratamento com IM. Também não houve diferença significativa na taxa de SG entre os pacientes que iniciaram IM em FC, FA e CB. Pacientes em FC no início do tratamento apresentaram uma taxa de SLP (82%) maior do que pacientes em FA (52%) e em CB (34%) ( $p = 0,003$ ) (Figura 9A). Com relação à SLE, as taxas foram de 57% e 35% aos 24 e 60 meses, respectivamente. Pacientes em FC no início do tratamento com IM apresentaram uma taxa de SLE (45%) maior do que pacientes em FA (27%) e em CB

(17%) ( $p = 0,02$ ) (Figura 9B). Ainda, pacientes sem mutações tiveram uma taxa maior de SLE (46%) do que pacientes com mutações (14%) ( $p = 0,02$ ) (Figura 9C).



**Figura 9.** Análises de sobrevida ( $p < 0,05$ ) quando considerado o período de tratamento com IM. (A) SLP e (B) SLE de acordo com a fase da doença no início do IM. (C) SLE de acordo com o *status* mutacional. O método Kaplan-Meier e teste log-rank foram utilizados.

## **2. Análise da expressão gênica de pacientes responsivos e não responsivos tratados com dasatinibe**

### **2.1. Amostras de pacientes**

Entre Julho de 2005 e Maio de 2007 foram coletadas amostras de sangue periférico de 18 pacientes com LMC tratados com dasatinibe e que foram previamente resistentes ao IM. A coleta foi realizada antes do início da terapia e após o período de um ano de tratamento, com exceção da amostra do paciente n° 76, coletada aos oito meses em razão do paciente ter sido excluído do protocolo por não apresentar resposta.

Amostras de RNA total de boa qualidade para os ensaios de microarranjos, pré e pós-tratamento, foram obtidas para 7 pacientes. No momento da coleta pós-tratamento, 3 pacientes foram classificados como responsivos (RCC: n = 2; RCP: n = 1) e 4 como não responsivos ( $\geq 90\%$  de metáfases Ph+) (Tabela 5).

No início do tratamento com dasatinibe, os pacientes tinham entre 25 e 66 anos de idade, com a mediana de 59 anos. Todos estavam em FC e apresentaram 100% de células Ph+, com exceção do paciente n° 73 (75% Ph+). Os 7 pacientes foram previamente tratados com IM e apresentaram resistência.

Os pacientes responsivos não tiveram mutações detectadas nas amostras pré e pós-tratamento. Dois dos quatro pacientes não responsivos tiveram as mutações G250E (n = 1) e F317L (n = 1) detectadas no domínio quinásico BCR-ABL antes do início do tratamento. A pesquisa de mutações pós-tratamento foi realizada somente para o paciente com a mutação F317L e foi confirmada.

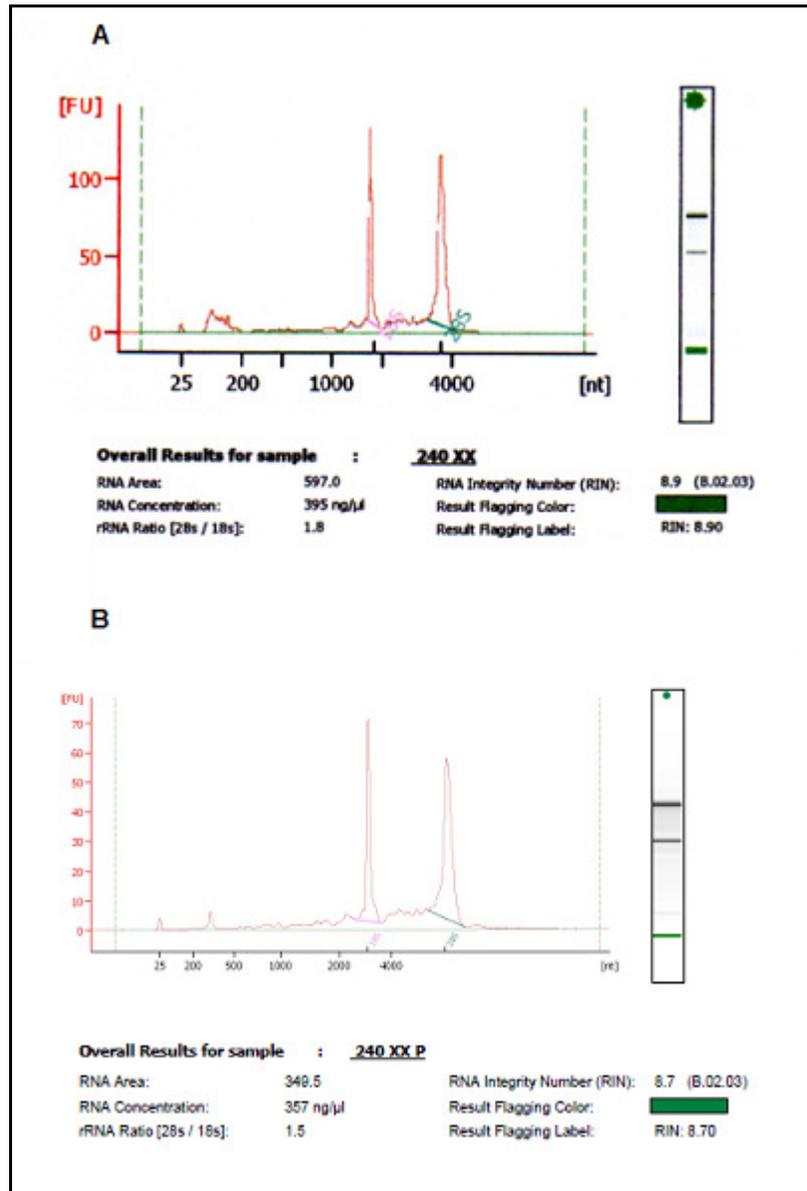
**Tabela 5.** Dados clínicos e hematológicos dos 7 pacientes com LMC tratados com dasatinibe.

	Responsivos				Não responsivos		
	72	73	74	75	3	76	77
<i>Número do paciente</i>	72	73	74	75	3	76	77
<i>Números das amostras</i>	136/221	150/240	152/234	128/239	131/205	148/195	155/235
<i>Gênero</i>	F	M	F	M	M	F	M
<i>Idade</i>	39	25	34	65	66	63	59
<i>Leucócitos, X 10<sup>9</sup>/L</i>	7,12	7,18	70	6,24	4,88	10,32	4,73
<i>Basófilos (%)</i>	2	3,7	12	3	1	4	0,3
<i>Eosinófilos (%)</i>	2,6	3,3	2	4	1	1	1,6
<i>Neutrófilos (%)</i>	66,1	54,6	62	66	55	44	73,3
<i>Monócitos (%)</i>	4,3	4,4	3	15	9	6	6,9
<i>Linfócitos (%)</i>	23,1	30,5	10	10	33	9	16,1
<i>Hemoglobina (g/dl)</i>	11,7	15,9	10,8	12,1	12	10,6	13,1
<i>Blastos (%)</i>	0	0	1	0	0	4	0
<i>Plaquetas, X 10<sup>9</sup>/L</i>	484	195	2514	205	118	193	203
<i>Tratamentos anteriores ao dasatinibe</i>	HU, IFN, IM	HU, IFN, araC, TCTH autólogo, IM	HU, IFN, araC, IM	HU, IFN, IM	HU, IFN, IM	HU, IFN, araC, IM	HU, IFN, araC, IM
<i>Mutações detectadas antes do tratamento</i>	ND	ND	ND	G250E	F317L	ND	ND
<i>Mutações detectadas após o tratamento</i>	ND	ND	ND	NR	F317L	ND	ND
<i>Metáfases Ph+ antes do tratamento (%)</i>	100	75	100	100	100	100	100
<i>Metáfases Ph+ após o tratamento (%)</i>	0	0	30	95	100	90	100
<i>Anormalidades citogenéticas após o tratamento</i>	8+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

F: feminino; M: masculino; HU: hidroxiuréia; IFN: interferon- $\alpha$ ; IM: mesilato de imatinib; ara-C: ara-C-citarabina; TCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas; ND: não detectado; NR: não realizado.

## **2.2. Obtenção de RNA total para os experimentos de hibridização**

As amostras de RNA total foram avaliadas quanto à integridade conforme descrito na seção 2.5 em Pacientes e Métodos. Sete pacientes tiveram amostras pré e pós-tratamento com razão 28S/18S, valor RIN e perfil eletroforético satisfatórios para os ensaios de microarranjos. Os perfis obtidos de uma das amostras antes e após os procedimentos de tratamento com DNase e purificação estão apresentados na Figura 10.



**Figura 10.** Eletroferograma de RNA total extraído de células mononucleares de sangue periférico de um paciente tratado com dasatinibe antes e após o processo de purificação. (A) RNA total não purificado. (B) RNA tratado com DNase I e purificado.

### **2.3. Análises dos dados de expressão**

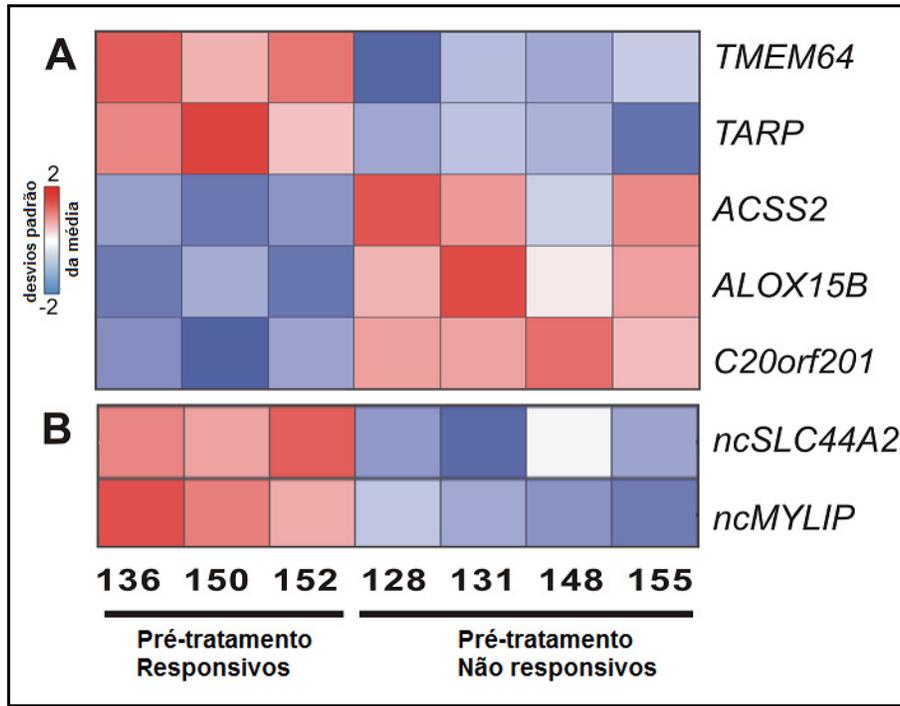
Após a normalização por quantil (pacote *Affy* na linguagem estatística R, ver Materiais e Métodos, seção 2.9), realizamos a média das réplicas técnicas Cy3 e Cy5 e aplicamos o método SAM para a identificação de transcritos diferencialmente expressos entre os subgrupos, a partir de análise não-pareada e 128 permutações. Também aplicamos o método LOOCV para todas as análises dos subgrupos.

Nosso objetivo foi estudar pacientes tratados com dasatinibe para identificar transcritos que pudessem estar envolvidos na resistência citogenética primária ao tratamento. Para isto, foram coletadas amostras de células mononucleares de sangue periférico, pré e pós-tratamento, de pacientes R e NR ao dasatinibe. Em razão de ser esperado que a população celular de pacientes responsivos ao tratamento seja predominantemente constituída de células normais, somente três tipos de amostras foram utilizadas para as comparações de perfis de expressão gênica, pré-R, pré-NR e pós-NR.

#### **2.3.1. Subgrupo 1 - Pré-tratamento responsivos *versus* Pré-tratamento de não responsivos**

Amostras de células mononucleares de sangue periférico de R e NR foram coletadas antes do início do tratamento com dasatinibe (pré-R e pré-NR) e usadas para investigação de expressão gênica em larga escala. Cinco genes codificadores de proteína foram significativamente expressos; entre eles, três tiveram expressão aumentada (*ALOX15B*, *ACSS2* e *C20orf201*) e dois tiveram expressão diminuída (*TARP* e *TMEM64*) nos NR (Figura 11A; Tabela 6). Adicionalmente, dois lncRNAs intrônicos senso

(*ncMYLIP* e *ncSLC44A2*), ambos com expressão diminuída nos NR foram identificados (Figura 11B; Tabela 7).



**Figura 11. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com dasatinibe.** (A) Cinco genes codificadores de proteína e (B) dois lncRNAs foram identificados como diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos. A resposta citogenética foi determinada após um ano de terapia com dasatinibe. Cada linha representa um gene (os símbolos estão indicados) e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um gene em relação à expressão média daquele gene em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um gene em todas as amostras.

**Tabela 6.** Lista dos cinco genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe.

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b><i>q-value</i><sup>*</sup></b>	<b><i>Fold Change</i><sup>‡</sup></b>
198437	C20orf201	chromosome 20 open reading frame 201	0,39	2,21
55902	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	2,68	2,10
247	ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase, type B	4,89	2,09
169200	TMEM64	transmembrane protein 64	0	-2,09
445347	TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	0	-2,17

<sup>\*</sup> *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>‡</sup> *Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

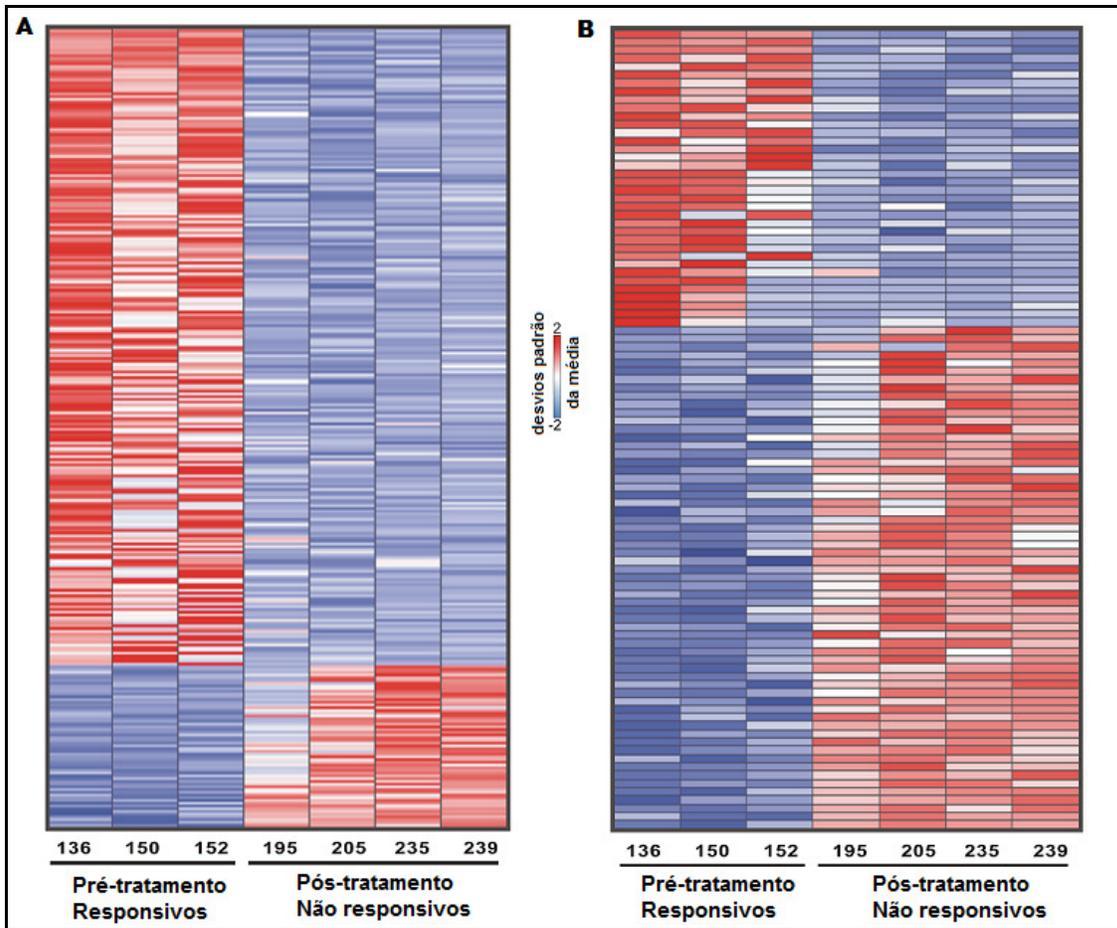
**Tabela 7.** Lista dos dois lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe.

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
29116	MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein	S-TIN	0	-1,59
57153	SLC44A2	solute carrier family 44, member 2	S-TIN	9,93	-1,55

\*Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso. <sup>‡</sup>q-value representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>§</sup>Fold Change é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais negativos correspondem a transcritos hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

### 2.3.2. Subgrupo 2 - Pré-tratamento responsivos *versus* Pós-tratamento de não responsivos

Para investigar possíveis candidatos moleculares ligados à resistência ao dasatinibe, amostras pré-tratamento de R (pré-R) foram comparadas a amostras pós-tratamento de NR (pós-NR). Um grupo de 329 sondas representando 285 genes codificadores de proteína únicos foi identificado como diferencialmente expresso entre as amostras. Destes, 58 e 227, respectivamente, foram encontrados com expressão aumentada e com expressão diminuída nos pacientes não responsivos (Figura 12A; Apêndice 2).



**Figura 12. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao dasatinibe.** (A) 285 genes codificadores de proteína e (B) 97 lncRNAs identificados como diferencialmente expressos entre as amostras. A resposta citogenética foi determinada após um ano de terapia com dasatinibe. Cada linha representa um gene (os símbolos estão indicados) e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um gene em relação à expressão média daquele gene em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um gene em todas as amostras.

A lista dos genes diferencialmente expressos foi submetida ao programa *Ingenuity* para a identificação de funções biológicas e mapeamento das redes gênicas e vias canônicas significativamente enriquecidas. Muitas funções foram identificadas como significativas pela análise global de funções ( $p < 0,05$ ), sendo as cinco mais significativas “Sinalização e Interação Celular”, “Desenvolvimento de Tecidos”, “Morfologia Celular”, “Desenvolvimento Celular” e “Morte Celular” (Tabela 8). Além disso, 11 redes gênicas foram identificadas como significativamente enriquecidas. A Tabela 9 mostra as cinco mais significativas; a primeira delas possui genes relacionados às funções “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico”, “Morfologia de Tecidos” e “Sinalização e Interação Celular”. Vias canônicas significativamente enriquecidas não foram encontradas para os genes diferencialmente expressos deste subgrupo de análise.

**Tabela 8.** As cinco funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
Sinalização e Interação Celular	<p>↑APLP2, ↑ATRN, ↑CASPI, ↑CD1D,</p> <p>↓CD226, ↓CD9, ↑CDH23, ↑CDKN2A,</p> <p>↓CLEC1B, ↓CLIC4, ↓CLU, ↓CNR2,</p> <p>↓CXCL5, ↓DAB2, ↓ESAM, ↓F13A1,</p> <p>↓FGFR1, ↓HES1, ↓IGKC, ↓IGHA1,</p> <p>↓IL2RA, ↓IL4, ↓IL8, ↓ITGA6, ↓ITGB5,</p> <p>↓JAM3, ↓KRT18, ↓LEPR, ↑LRP1,</p> <p>↑MARCO, ↑NRG1, ↓P2RY12, ↓PRKAR2B,</p> <p>↓PTK2, ↑SERPINI2, ↓SLC6A4, ↓SNCA,</p> <p>↓TFPI, ↓THBD, ↓THBS1, ↓TPM1</p>	<p>1,94E-03 -</p> <p>5,96E-02</p>	41
Desenvolvimento de Tecidos	<p>↑APLP2, ↑ATRN, ↑CASPI, ↓CD226,</p> <p>↓CD9, ↑CDH23, ↑CDKN2A, ↓CLIC4,</p> <p>↓CLU, ↓CNR2, ↓DAB2, ↓ESAM, ↓FGFR1,</p> <p>↑FGFRL1, ↓GPX1, ↓HES1, ↓IGHA1, ↓IL4,</p> <p>↓IL8, ↓ITGA6, ↓ITGB5, ↓JAM3,</p> <p>↑MARCO, ↑NRG1, ↓MAX, ↓P2RY12,</p> <p>↓PTK2, ↑SERPINI2, ↓TFPI, ↓THBD,</p> <p>↓THBS1, ↓TPM1</p>	<p>1,94E-03 -</p> <p>5,96E-02</p>	32
Morfologia Celular	<p>↑ATRN, ↓AVIL, ↓CD9, ↑CDKN2A,</p> <p>↓CLIC4, ↓CTTN, ↓DAB2, ↓ESAM,</p> <p>↓FGFR1, ↓HES1, ↓IL2RA, ↓IL4, ↓IL8,</p> <p>↓ITGA6, ↓ITGB5, ↓KRT18, ↑LRP1,</p> <p>↑MARCO, ↑NRG1, ↓ODC1, ↓P2RY12,</p> <p>↓PLA2G12A, ↓PRKAR2B, ↓PTK2,</p>	<p>1,94E-03 -</p> <p>5,96E-02</p>	30

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
	↓RUFY1, ↑SULF2, ↓THBD, ↓THBS1, ↓TPM1, ↓VIL1		
Desenvolvimento Celular	↓ACRBP, ↓AHCTF1, ↑ATRN, ↓AVIL, ↑CASP1, ↑CD1D, ↓CD226, ↑CDH23, ↓CD9, ↑CDKN2A, ↑CIITA, ↓CLIC4, ↓CLU, ↓CNR2, ↓DAB2, ↓ELOVL7, ↓ESAM, ↓FGFR1, ↓GPX1, ↓GRAP2, ↓HES1, ↓IGLL1, ↓IL2RA, ↓IL4, ↓IL8, ↓ITGA6, ↓ITGB5, ↓LEPR, ↑LRP1, ↓MAX, ↓NCOA4, ↑NRG1, ↓ODC1, ↓PDE5A, ↓PRKAR2B, ↓P2RY12, ↓PTK2, ↓SMOX, ↓SNCA, ↓THBD, ↓THBS1, ↓TPM1, ↓VIL1	1,94E-03 - 5,96E-02	43
Morte Celular	↓ARG2, ↑C8G, ↑CASP1, ↓CASP14, ↑CD1D, ↓CD226, ↓CD9, ↑CDKN2A, ↑CIITA, ↓CLIC4, ↓CLU, ↓CNR2, ↑CTSS, ↓CTTN, ↓DAB2, ↑DNASE2, ↓F13A1, ↓FGFR1, ↓G0S2, ↓GPX1, ↓GRAP2, ↓GSTM5, ↓HES1, ↑HLA-DRB4, ↑H6PD, ↓IGKC, ↓IL2RA, ↓IL3RA, ↓IL4, ↓IL8, ↓ITGA6, ↓ITGB5, ↓KRT18, ↓LEPR, ↑LRP1, ↓MAX, ↓MZB1, ↓NCOA4, ↑NRG1, ↓NRGN, ↑OAS1, ↓ODC1, ↓PDE5A, ↑PLA2G7, ↓PRKAR2B, ↑PSAP, ↓PTK2, ↓RYBP, ↑SGMS2, ↓SMOX, ↓SNCA, ↓SNN, ↓THBD, ↓THBS1, ↓TIAM2, ↓TPM1, ↑UBQLN1	3,19E-03 - 5,96E-02	57

\* p-valor corrigido pelo múltiplo teste Benjamini-Hochberg

**Tabela 9.** As cinco redes gênicas mais significativamente enriquecidas para genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferencial- mente expressos</b>	<b>Funções</b>
1	↓CD9, ↓CD226, ↑CD1D, ↑CIITA, ↓CXCL5, ↓G0S2, Gm-csf, ↓GMPR, ↓GRAP2, HLA-DR, ↑HLA-DRB4, Ifn gamma, IgG, IgG1, ↓IGKC, ↓IGLL1, IL12 (complex), ↓IL2RA, Immunoglobulin, Interferon alpha, ↓ITGA6, ↑MARCO, MHC CLASS I (family), MHC Class II (complex), ↓MZB1, NFAT (complex), NFκB (complex), ↑PSAP, Ptk, ↓RNF11, ↓SMOX, ↓SPHAR, TCR, ↓TFPI, ↑TPMT	38	21	Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico, Morfologia de Tecidos, Sinalização e Interação Celular
2	14-3-3, 26s Proteasome, ↓ABLM3, Actin, Akt, Alpha tubulin, ↓ARHGAP18, ↑CASP1, ↓CASP14, Caspase, ↑CDKN2A, ↓CLIC4, Cytochrome c, F Actin, ↓FGFR1, FSH, HISTONE, Hsp70, Hsp90, Iga, ↓IGHA1, Jnk, ↓KRT18, ↑LACTB, ↓NAP1L1, Nos, P38 MAPK, ↑PLA2G7, RNA polymerase II, ↑SERPINI2, ↓SNCA, ↓TPM1, Ubiquitin, ↑UBQLN1, ↓VIL1	28	17	Câncer, Desordem Genética, Doenças do Sistema Reprodutivo

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferencial- mente expressos</b>	<b>Funções</b>
3	↓ARG2, Arp2/3, ↓COL10A1, collagen, Collagen type I, Collagen(s), ↑CTSS, ↓CTTN, ↓DAB2, ↓EHD3, ERK1/2, Fibrinogen, Focal adhesion kinase, Integrin, Integrin alpha 3 beta 1, Integrin alpha 6 beta 1, Integrin alpha V beta 3, ↓ITGB5, ↑LRP1, Mek, ↓NEXN, Pak, Pdgf (complex), PDGF BB, ↓PDLIM1, ↓PTK2, Rac, Rap1, ↓RASGRP3, ↓SLC6A4, Sos, Tgf beta, ↓THBD, ↓THBS1, ↑UGDH	27	16	Sinalização e Interação Celular, Comprometimento Celular, Doença Cardiovascular
4	ADCYAP1, ↓AGPAT1, ↑ATRN, ↑C8G, Ca2+, ↓CLEC1B, ↑CPVL, ↓DAB2, F9, GNB2L1, Hat, ↓HGD, HNF4A, IBSP, IL1B, LRP5, ↓LRP12, LRPAP1, MAP3K3, ↓MAST4, NR1I3, ↓NRGN, ↓PDE5A, ↓PLA2G12A, ↓PSD3, SLC1A3, ↑SLC24A4, SMAD1, ↑SMURF2, SPARC, TCF4, thyroxine, ↓TMEM140, VCAN, xanthine	26	16	Metabolismo de aminoácidos, Transporte Molecular, Bioquímica de Pequenas Moléculas
5	Adaptor protein 2, ADCY, Alp, Ap1, ↑CCDC71, ↓CLU, Creb, Fgf, glutathione transferase, ↓GPX1, Growth hormone, ↓GSTM5, ↓GSTT1, hCG, Hdac, ↓HES1, Histone h3, Histone h4, IL1, ↓IL8, ↓IL1R2, ↓IL3RA, Insulin, LDL, ↓LEPR, Lh, ↑NRG1, ↓ODC1, PI3K (complex), ↓PRKAR2B, Pro-inflammatory Cytokine, ↑PTPN9, Rb, STAT5a/b, Vegf	22	14	Doenças Dermatológicas, Doenças Inflamatórias, Desordens do Desenvolvimento

A partir do uso do microarranjo customizado pudemos identificar 97 lncRNAs como diferencialmente expressos entre as amostras deste subgrupo. Estes lncRNAs mapeiam em regiões intrônicas de genes codificadores de proteína, 61 dos quais com expressão aumentada e 36 com expressão diminuída nos NR (Figura 12B; Apêndice 3). Considerando os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* genômicos dos lncRNAs intrônicos diferencialmente expressos, três funções foram encontradas como significativamente enriquecidas ( $p < 0.05$ ): “Morte Celular”, “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico” e “Desenvolvimento de Tecidos” (Tabela 10). Adicionalmente, seis redes gênicas significativamente enriquecidas incluindo genes relacionados à “Morfologia Celular”, “Desenvolvimento Celular”, “Câncer”, “Expressão Gênica”, “Modificação Pós-Traducional” e “Morte Celular” foram identificadas. As cinco primeiras estão na Tabela 11. Vias canônicas significativamente enriquecidas não foram encontradas para este grupo de transcritos.

**Tabela 10.** As três funções biológicas significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
Morte Celular	↓ABCC3, ↓ATP2A2, ↓ATXN1, ↓BACH2, ↑CAST, ↑CD44, ↑DDX5, ↑EIF3H, ↓FOXO3, ↑IRF1, ↓MAML2, ↑MAPK13, ↑MAPKAP1, ↓MAX, ↓MGMT, ↓MLANA, ↑MLH1, ↓MLL, ↑PCSK6, ↓PECAM1, ↑PRDM5, ↑PRKAR1A, ↑PSAP, ↑RTN4, ↓SPARC, ↓TGM2, ↓THBS1, ↓TNFAIP8, ↑XBP1	1,41E-02 - 1,19E-01	29
Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico	↓BACH2, ↑CAST, ↑CD44, ↓ENTPD1, ↓FOXO3, ↑HNRNPA2B1, ↑IRF1, ↑MAPKAP1, ↓MLANA, ↓MLL, ↓PECAM1, ↓TGM2, ↓THBS1, ↑XBP1	1,89E-02 - 1,29E-01	14
Desenvolvimento de Tecidos	↑CAST, ↑CD44, ↑CEP290, ↓ENTPD1, ↓MLANA, ↓PECAM1, ↑RTN4, ↓SPARC, ↓TGM2, ↓THBS1	1,89E-02 - 1,20E-01	10

\* p-valor corrigido pelo múltiplo teste Benjamini-Hochberg

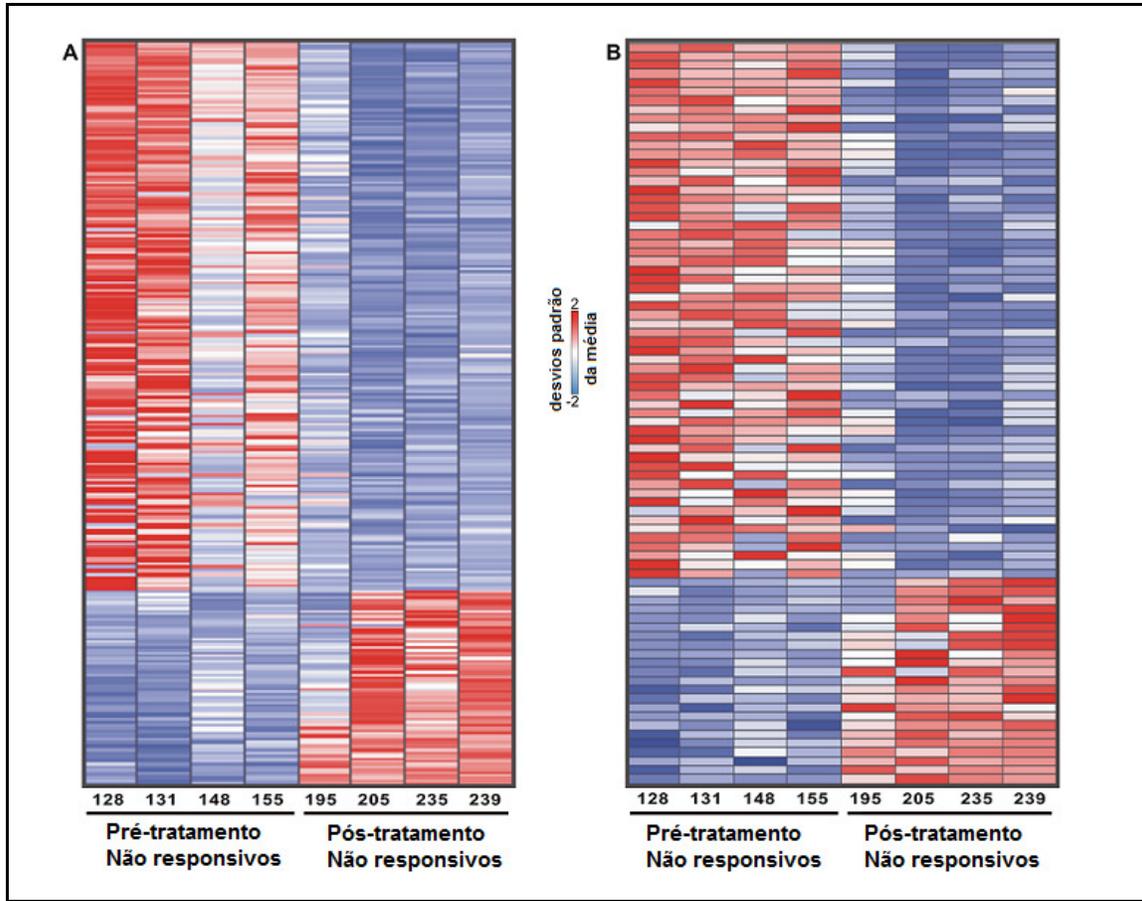
**Tabela 11.** As cinco redes gênicas mais significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Redes	Moléculas na rede	Score (- log p-value)	Genes diferencialmente expressos	Funções
1	Akt, Ap1, ↓ATP2A2, ↓BLVRB, Calpain, ↑CAST, ↑CD44, collagen, Collagen type I, Collagen type IV, Collagen(s), ↓ENTPD1, Fibrinogen, ↓FOXO3, FSH, ↓GMPR, IL1, Immunoglobulin, Lh, ↑MAPK13, P38 MAPK, Pdgf (complex), ↓PECAM1, ↑PRKAR1A, ↑PSAP, ↑PSMD7, ↑RAB1A, ↓SH3PXD2A, ↓SPARC, Tgf beta, ↓TGM2, ↓THBS1, ↓TLN1, ↑UTRN, Vegf	37	19	Morfologia Celular, Desenvolvimento Celular, Metabolismo de Carboidratos
2	26s Proteasome, ↓ABLIM1, ↓ATXN1, Calmodulin, Caspase, Ck2, ↑ELF1, ↓EPS15, F Actin, FAM48A, HDGF, Histone h3, Histone h4, HMGN1, ↑HNRNPA2B1, ↓INVS, ↑IQGAP1, ↑IRF1, Mapk, ↓MAX, Mediator, ↓MGMT, ↓MLL, ↑MMS19, NFkB (complex), Pka, ↓RAD23A, SPIB, ↑TAF6L, TLR10, ↓TNFAIP8, TXLNG, Ubiquitin, ↑USP15, ↑XBP1	33	17	Câncer, Expressão Gênica, Desenvolvimento Celular

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferencial- mente expressos</b>	<b>Funções</b>
3	beta-estradiol, ↓BICD1, BRIP1, CCNG2, CST3, ↑CTSH, D-glucose, E2F4, EGFR, ↑FOXN3, ↑GBA2, GSTM3, HNF4A, ↑IFI30, IPO13, ISCU, ↑LRP8, ↑MAPKAP1, MATN2, ↑MB, MBD4, ↑MLH1, POLE2, ↑POLE3, PPP2R2B, RECQL, ↑REEP3, SBF1, SFN, SYNJ2BP, TBL3, TEAD4, ↓TMCO3, ↑TMLHE, ↑URM1	26	14	Câncer, Doença Gastrointestinal, Desenvolvimento e Função do Sistema Nervoso
4	AKT1S1, ↑APLP2, ATF7, ATP5A1, ↑ATP5B, ↓BACH2, CAB39, ↑CEP290, ↓CHST15, CREB5, CSF2, CYP2J2, DOCK7, galactose, HCK, JUN, KLC2, ↑KLC3, MAFG, MAFK, MAPK10, MARK1, MARK2, ↓MLANA, ↑PSMD2, S100A6, SIK1, SIK3, SILV, STK38, ↓STRADA, TLR1, ↓TUBB1, ↓WWC2, YWHAZ	19	11	Expressão Gênica, Modificação Pós-Traducional, Desordem do Desenvolvimento
5	ADCYAP1R1, AKAP2/PALM2-AKAP2, ↓ANK3, BAI1, BAI2, CALCR, CD99, CDH4, CDK5, ↑CDK5RAP2, CELSR1, ↓CHD2, CNTN1, CSHL1, CTNNB1, ↑DDX5, DKK3, ↑EIF3H, FBXO33, Gpcr, GPR1, ↑GPR133, GPR143, HGF, HSP90AB1, MAML1, ↓MAML2, MAPK6, NOTCH1, ↓PCCA, ↑PCSK6, PGK1, ↑PRDM5, ↑RTN4, SRC	18	11	Desenvolvimento e Função do Sistema Nervoso, Câncer e Morte Celular

### **2.3.3. Subgrupo 3 - Pré-tratamento de não responsivos *versus* Pós-tratamento de não responsivos**

A investigação de genes diferencialmente expressos entre pré e pós-tratamento de NR (pré-NR e pós-NR) ao dasatinibe foi realizada no intuito de revelar possíveis mecanismos de resistência exclusivos a este grupo de pacientes. A maioria dos genes codificadores de proteína (198 de 268 dos genes diferencialmente expressos) (Figura 13A; Apêndice 4) e de lncRNAs intrônicos (60 de 83 mensagens diferencialmente expressas) (Figura 13B; Apêndice 5) apresentou expressão diminuída após o tratamento, sugerindo uma supressão de vários processos biológicos pelo dasatinibe.



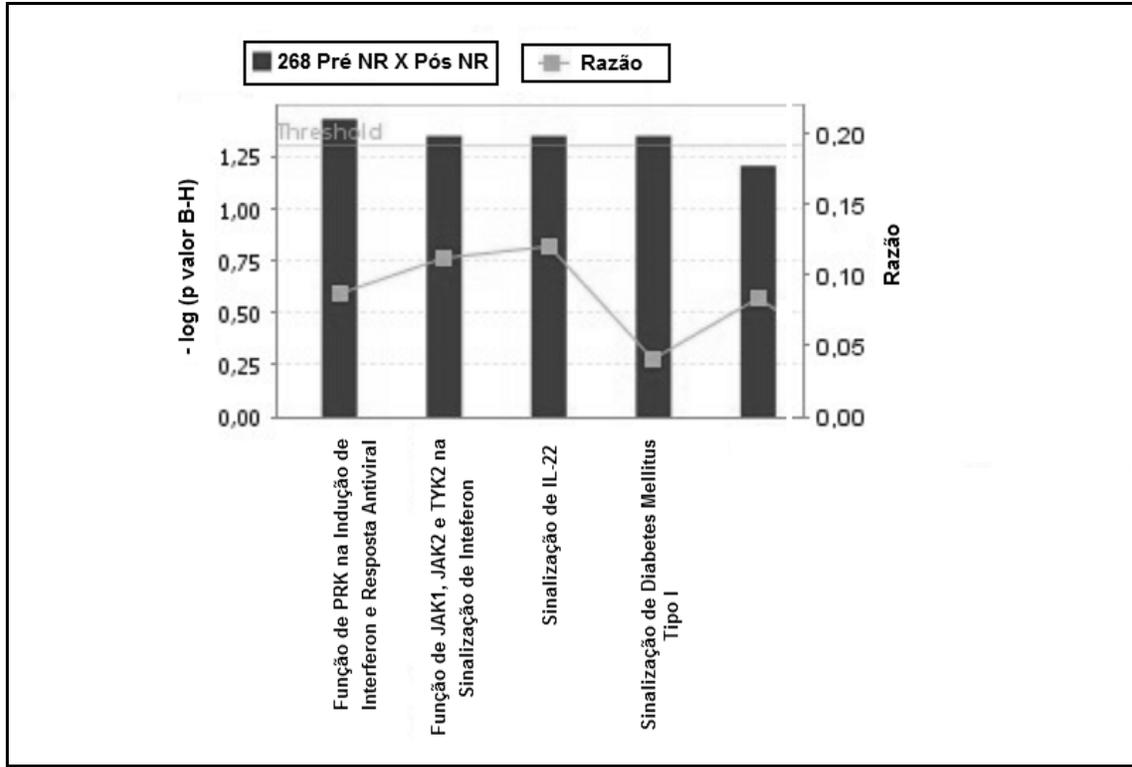
**Figura 13. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC não responsivos pré e pós-tratamento com dasatinibe. (A)** 285 genes codificadores de proteína e **(B)** 83 lncRNAs identificados como diferencialmente expressos entre as amostras. A resposta citogenética foi determinada após um ano de terapia com dasatinibe. Cada linha representa um gene (os símbolos estão indicados) e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um gene em relação à expressão média daquele gene em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um gene em todas as amostras.

Muitas funções significativamente enriquecidas foram identificadas a partir dos genes diferencialmente expressos entre as amostras pré-NR e pós-NR com o uso do programa IPA. As cinco mais significativas foram “Mecanismo de Infecção”, “Doença Infecciosa”, “Morte Celular”, “Resposta Imune” e “Desenvolvimento Celular” (Tabela 12). Quatro vias canônicas foram identificadas como significativamente enriquecidas ( $p < 0,05$ ;  $-\log p > 1.3$ ): “Função de PKR na Indução de Interferon e Resposta Antiviral”, “Função de JAK1, JAK2 e TYK2 na Sinalização de Interferon”, “Sinalização de IL-22” e “Sinalização de Diabetes Mellitus Tipo I” (Figura 14; Tabela 13). Adicionalmente, oito redes gênicas foram identificadas como significativamente enriquecidas. A Tabela 14 mostra as cinco mais significativas; a primeira delas com genes relacionados à “Sinalização e Interação Celular”, “Função e Manutenção Celular” e “Resposta Inflamatória”.

**Tabela 12.** As cinco funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes diferencialmente expressos entre as amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

<b>Função</b>	<b>Genes</b>	<b>p-valor corrigido*</b>	<b>Número total de genes</b>
Mecanismo de Infecção	↑AKT1, ↑APOBEC3G, ↑FASLG, ↑IFNG, ↓PTPRC, ↑SIKE1, ↑STAT1, ↑TBL3, ↑TYK2	3,66E-03 - 4,57E-02	9
Doença Infecçiosa	↑CASP8, ↑CX3CR1, ↑FASLG, ↑GZMA, ↑IFNG, ↓MPL, ↓PTPRC, ↑STAT1, ↑TYK2	4,53E-03 - 4,38E-02	9
Morte Celular	↑AKT1, ↑CASP8, ↓CBX5, ↓EGLN3, ↓ELAVL1, ↑FASLG, ↑GZMA, ↓ID1, ↑IFNG, ↑IP6K2, ↓ITGB3, ↑KLRK1, ↓LTBP1, ↓MPL, ↑PLEKHF1, ↓POU5F1, ↓PTPRC, ↑PXN, ↑STAT1, ↑TCP1, ↓THBS1, ↓TRIM10, ↑TYK2	4,53E-03 - 4,68E-02	23
Resposta Imune	↑AKT1, ↑CASP8, ↑FASLG, ↑GZMA, ↓ID1, ↑IFNG, ↓LTBP1, ↓PTPRC, ↑STAT1, ↓THBS1, ↑TOX, ↑TYK2	4,53E-03 - 4,07E-02	12
Desenvolvimento Celular	↑AKT1, ↑CASP8, ↓CBX5, ↓CELF1, ↓EGLN3, ↓ELAVL1, ↑FASLG, ↓GRB14, ↑GZMA, ↓ID1, ↑IFNG, ↑IL13RA1, ↓ITGB3, ↑KLRK1, ↓LTBP1, ↓LPP, ↓MPL, ↓NFIA, ↓PBX1, ↓PLCB1, ↓PLCB1, ↓POU5F1, ↓PTPRC, ↑PXN, ↑STAT1, ↑STYX, ↑TCP1, ↓THBS1, ↑TOX, ↑TXLNA, ↓TRIM10, ↑TYK2, ↓ZEB2	4,53E-03 - 4,58E-02	33

\* p-valor corrigido pelo múltiplo teste Benjamini-Hochberg



**Figura 14.** Vias canônicas identificadas pelo programa *Ingenuity Pathway Analysis* como significativamente enriquecidas com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe.

**Tabela 13.** Vias canônicas significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Vias canônicas	Genes	*p-valor corrigido
Função de PKR na Indução de Interferon e Resposta Antiviral	↑AKT1, ↑CASP8, ↑IFNG, ↑STAT1	3,74 E-02
Função de JAK1, JAK2 e TYK2 na Sinalização de Interferon	↑IFNG, ↑STAT1, ↑TYK2	4,51E-02
Sinalização de IL-22	↑AKT1, ↑STAT1, ↑TYK2	4,51E-02
Sinalização de Diabetes Mellitus Tipo I	↑CASP8, ↑FASLG, ↑IFNG, ↓IL1RAP, ↑STAT1	4,51E-02

\* p-valor corrigido para múltiplo teste (Benjamini-Hochberg)

**Tabela 14.** As cinco redes mais significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferencial- mente expressos</b>	<b>Funções</b>
1	Alpha Actinin, Alpha tubulin, ↓C1QTNF2, Calpain, CaMKII, ↑CAPRIN1, Collagen type I, Collagen type IV, Collagen(s), ↓CSRP2, ↓ELAVL1, Eotaxin, ERK1/2, F Actin, ↓FGD4, ↓FLJ11292, Focal adhesion kinase, Ige, ↓ITGB3, ↓LPP, Pak, Pdgf (complex), PDGF BB, ↓PLCB1, ↓PLOD2, PP2A, ↓PPP1R14A, ↑PXN, Rock, ↓SLC6A6, Smad, Talin, Tgf beta, ↓THBS1, ↓TNS1	28	15	Sinalização e Interação Celular, Função e Manutenção Celular, Resposta Inflamatória
2	Adaptor protein 2, ↓ARL17A/ARL17B, ATP, ↑C14orf129, ↑C1orf156, ↑COQ10B, ↑CYB5B, EWSR1, GH1, GSK3B, GTP, HNF4A, Lh, ↓MTMR1, MTOR, MYB, ↓N4BP2, PDZK1, phosphatidylinositol-3-phosphate, PMS1, PRKAB1, PTMA, ↑PXN, ↑RAB4B, RAB7A, RANBP1, RUVBL2, ↑SEC24C, SEC31A, ↓SLC26A6, ↑SNX17, ↓STON2, ↓TNRC6A, TOLLIP, ↑TOX	27	15	Metabolismo de Lipídios, Metabolismo de Ácidos Nucleicos, Bioquímica de Pequenas Moléculas

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferencial- mente expressos</b>	<b>Funções</b>
3	26s Proteasome, ↑AKT1, Akt, Ap1, ↓CBX5, ↓CELF1, ↓EGLN3, FSH, ↓GRB14, Growth hormone, Gsk3, hCG, ↓HDLBP, ↓HGS, Histone h3, Histone h4, Hsp70, Hsp90, ↓ID1, Insulin, LDL, Lh, Nos, P38 MAPK, p85 (pik3r), ↓PBX1, PI3K (complex), ↓POU5F1, ↑RANGAP1, RNA polymerase II, ↑TCP1, ↓TOM1L2, Ubiquitin, Vegf, ↓ZEB2	24	14	Morte Celular, Desenvolvimento Celular, Proliferação e Crescimento Celular
4	↑APOBEC3G, ↑APOL2, BCR, ↑CASP8, Caspase, CD3, CD8, Cytochrome c, ↑FASLG, ↑GCH1, Hsp27, Ifn, IFN alpha/beta, IFN Beta, Ifn gamma, IFN TYPE 1, IL23, IL12 (complex), IL12 (family), IL12 receptor, ↑IL13RA1, ↓IL1RAP, Immunoglobulin, Interferon alpha, ↑IP6K2, JAK, ↑KLRK1, ↓MPL, NFkB (complex), ↓PTPRC, ↑STAT1, STAT5a/b, TCR, Tnf receptor, ↑TYK2	23	13	Doença Infecciosa, Morte Celular, Doença Imunológica
5	↓ANK3, ATM, ↑CBWD3/CBWD6, ↓DNM3, EGFR, EIF4A2, EIF4EBP1, FYN, GATA5, ↑HSD17B7, IL1B, KPNB1, ↑MAT2B, MET, MTOR, MYB, ↓MYL4, NFE2, OLIG1, Pias, PRKDC, ↑PTPN4, RAN, ↑RNF167, ↑SCAMP1, ↓SF1, SMAD2, ↓SMG1, SP1, SRF, SUMO1, TCF3, TP53, UBE2E1, ↓ZNF292	20	12	Desenvolvimento Celular, Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico, Desenvolvimento e Função do Sistema Nervoso

Considerando os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs intrônicos diferencialmente expressos, quatro redes gênicas significativamente enriquecidas foram identificadas. Estas redes incluem genes envolvidos na “Organização Celular”, “Manutenção e Função Celular”, “Desordem Genética”, “Câncer” e “Doença Hematológica” (Tabela 15). As análises realizadas pelo programa IPA não identificaram funções biológicas ou vias canônicas significativamente enriquecidas para este grupo de transcritos.

**Tabela 15.** Quatro redes gênicas significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe, segundo o programa *Ingenuity Pathway Analysis*.

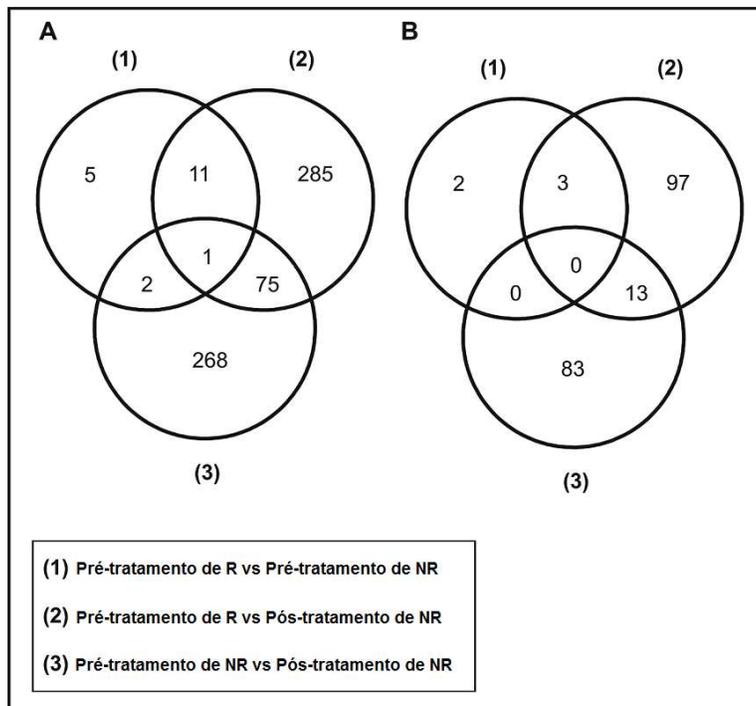
Redes	Moléculas na rede	Score (- log p- value)	Genes diferencialmente expressos	Funções
1	14-3-3, ↓ACIN1, ↑ANXA6, ↓BRAF, Calcineurin protein(s), Caspase, ↑CCNL1, ↓CD44, ↑CD74, ↑CIB1, ↓CMIP, ↑EIF4G2, ERK1/2, ↑FLNA, ↓FNBP1, Focal adhesion kinase, ↑HLA-DMB, Hsp90, ↓ITPR1, ↑JAK1, ↓MAPKAPK2, NFκB (complex), ↓NISCH, p85 (pik3r), Pdgf (complex), PDGF BB, ↓PICALM, ↓PTPRJ, Ras, Ras homolog, ↓RASA1, ↑RHOF, Shc, ↓UBR5, Vegf	44	21	Organização Celular, Manutenção e Função Celular, Metabolismo de Aminoácidos
2	Actin, ADAM23, Akt, ↓ANKRD11, ↓ARID1B, ↓ATAD2, ↓BCAS3, Calmodulin, CDK18, ↓CUL3, Cyclin E, ↓CYTH1, DENND4A, ↓DYRK1A, ERK, Histone h3, HMGN1, ↑HSPA5, Mapk, ↓NCOA3, PCYT1A, PGLYRP1, PI3K (complex), RNA polymerase II, ↓SEC31A, ↓SFPQ, ↓SIK3, ↓SIL1, SLC27A2, ↓SLC9A8, ↓SMARCC1, ↓TG, ↑TRA2B, ↑WASF2, ↓YWHAZ	40	19	Desordem Genética, Doença Neurológica, Doença Oftalmológica

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferencialmente expressos</b>	<b>Funções</b>
3	↓AFF1, AFF4, ↓ATAD2, BIRC6, ↓BRE, Calpain, CAPN5, ↓CAPN7, CAPN8, CAPN9, CAPN11, CASP12, ↓CCDC50, ↑CEP192, ↓EXOC1, ↓EXOC4, EXOC6, ↑FMNL1, ↓LEO1, MAPK9, ↓MINK1, MYC, RAC1, ↑REEP5, RNF43, ↓RNF115, RPS7, SIAH1, TP53, UBC, UBE2A, UBE2B, UBE2D1, UBE2E3, ↓ZFAND3	26	14	Câncer, Doença Hematológica, Modificação Pós-Traducional
4	ALDH3A2, ↓ATXN10, BET1, ↓C9orf3, ↑CCNF, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CLU, Collagen type IV, ↓DPYD, EMX2, ↓EXT1, FOS, IL5, ILK, Immunoglobulin, KBTBD8, NFYB, ↓NFYC, ↓PBX3, ↑PCSK7, PGM3, ↓QSOX1, SALL4, SDF2, SHOX2, SPECC1, ↓STAG2, ↓TBC1D22A, TGFB1, TXNDC12, WAPAL, ↓ZNF652, ZNF417/ZNF587	22	12	Desenvolvimento do Organismo, Anormalidades e Injúria do Organismo, Doença Respiratória

#### 2.3.4. Comparações entre os subgrupos de amostras

As comparações entre os três subgrupos de amostras estão ilustradas no diagrama de Venn (Figura 15). A Figura 15A mostra que a comparação entre o subgrupo 1 (pré-R versus pré-NR) e subgrupo 2 (pré-R versus pós-NR) identificou 11 genes codificadores de proteína exclusivamente em comum. Entre eles estão genes envolvidos na apoptose (*PAWR*), adesão celular (*CD84*) e regulação da tradução (*IGF2BP3*) (Apêndice 6). Adicionalmente, a Figura 15B mostra que três lncRNAs (*ncCHES1*, *ncPRKCB1* e *ncRNPEP*) foram identificados em comum entre estes dois subgrupos de pacientes (Apêndice 7). A maioria dos genes diferencialmente expressos identificados nas amostras pré-tratamento (11/19) foram comumente identificados no subgrupo 2, sugerindo que as modificações de expressão relacionadas à resistência nos NR após o tratamento já haviam sido detectadas usando apenas as amostras pré-tratamento.

A Figura 15A mostra ainda que comparando o subgrupo 2 (pré-R versus pós-NR) e subgrupo 3 (pré-NR versus e pós-NR), um grupo de 76 genes foi encontrado em comum (Apêndice 8). Exemplos incluem *ABCC3* (*ATP-binding cassette, sub-family C*) e *PTGS1* (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 1*). Adicionalmente, 13 lncRNAs intrônicos foram encontrados em comum entre estes subgrupos (Figura 15B) (Apêndice 9).



**Figura 15. Diagrama de Venn com os transcritos diferencialmente expressos identificados pelas três diferentes comparações das amostras dos pacientes com LMC. (A) genes codificadores de proteína identificados a partir da plataforma *Whole Human Genome G4112F Microarray*. (B) lncRNAs identificados a partir da plataforma customizada. Grupos 1 a 3 correspondem às comparações das amostras dos pacientes indicadas no quadro.**

### **3. Análise da expressão gênica de pacientes responsivos e não responsivos tratados com IM**

#### **3.1. Amostras de pacientes**

Entre Julho de 2005 e Março de 2008 foram coletadas amostras de sangue periférico de 32 pacientes com LMC pré e pós-tratamento com IM.

Amostras de RNA total a partir de células mononucleares de sangue periférico de 30 pacientes apresentaram qualidade suficiente e foram utilizadas nas etapas de amplificação e hibridização. No entanto, para as análises dos dados foram incluídos os pacientes com as seguintes características: início do tratamento com IM em até 12 meses após o diagnóstico, FC, ausência de mutações no domínio quinásico ABL e mesmo tipo de resposta apresentada aos 12 meses de tratamento e na data de coleta da amostra pós-tratamento. Vinte e um pacientes obedeceram estes critérios, sendo 17 considerados responsivos por apresentarem resposta ótima e 4 não responsivos por manterem resposta subótima (Tabela 16).

Os pacientes tinham entre 20 e 79 anos de idade ao diagnóstico, com mediana de 44 anos. Em relação aos tratamentos anteriores ao IM, os pacientes receberam HU (n = 16), IFN- $\alpha$  (n = 1) e HU + IFN- $\alpha$  (n = 4). A coleta das amostras pós-tratamento foi realizada entre 1 e 2,6 anos de tratamento.

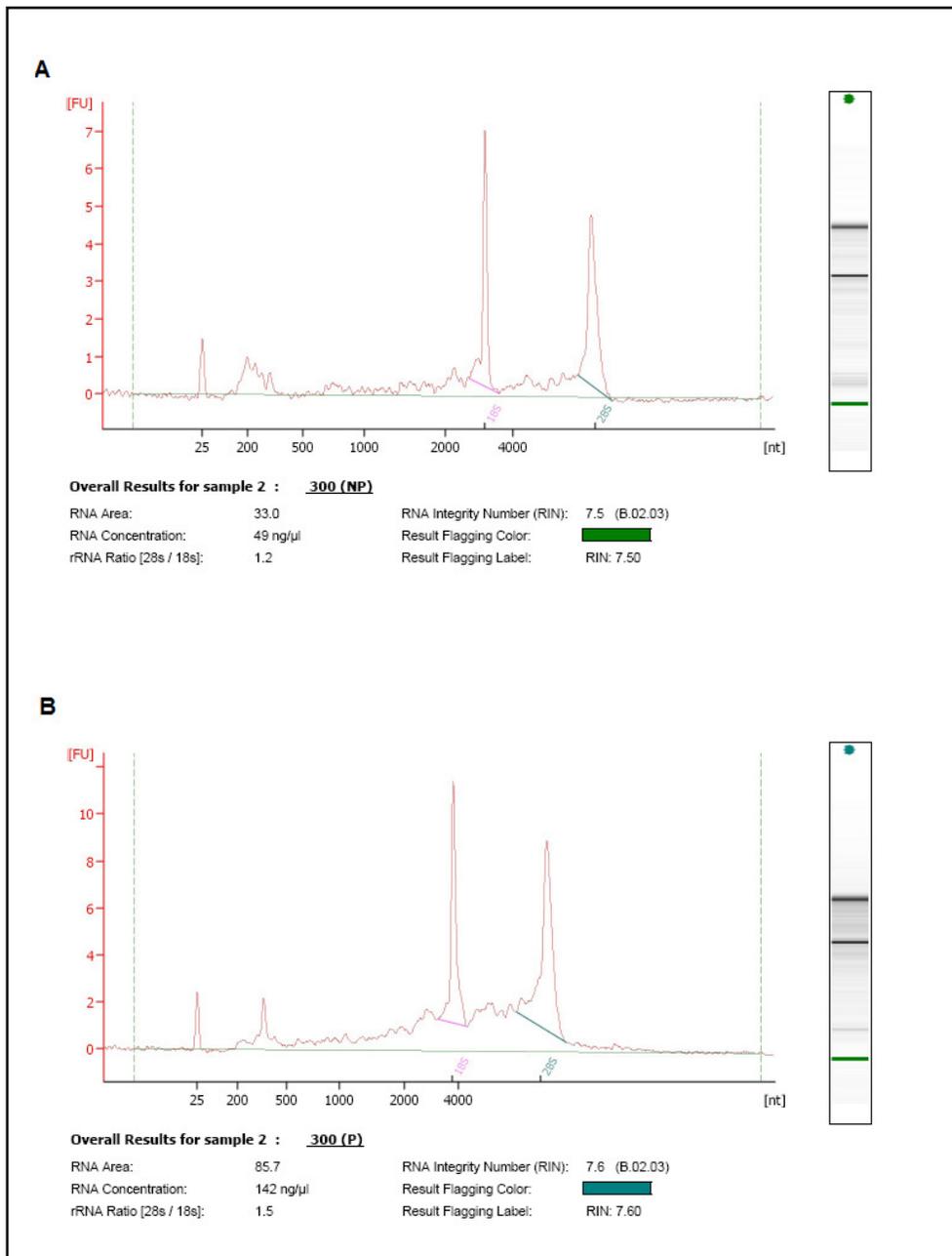
**Tabela 16.** Dados clínicos dos pacientes tratados com IM e analisados pela técnica de microarranjos.

Paciente n°	Números das amostras	Idade ao diagnóstico (anos)	Gênero	Tratamentos anteriores ao IM	Resposta aos 12 meses e na coleta pós-tratamento	Tempo de uso de IM na coleta pós-tratamento (anos)
78	111/328	32	M	HU/IFN	Resposta Ótima	2,0
79	113/327	41	F	HU/IFN	Resposta Ótima	2,0
80	123/330	40	M	HU/IFN	Resposta Ótima	2,3
81	137/306	28	M	HU	Resposta Ótima	1,7
82	140/313	41	M	HU	Resposta Ótima	1,6
83	146/318	64	F	HU/IFN	Resposta Ótima	2,4
84	160/310	20	M	HU	Resposta Ótima	1,9
85	169/331	39	M	HU	Resposta Ótima	1,6
86	170/332	51	M	HU	Resposta Ótima	1,7
87	172/312	52	M	HU	Resposta Ótima	1,6
88	173/352	66	F	HU	Resposta Ótima	1,9
89	174/346	30	M	HU	Resposta Ótima	1,6
90	182/308	64	F	HU	Resposta Ótima	1,4
91	184/322	36	M	HU	Resposta Ótima	1,4
92	203/311	57	F	HU	Resposta Ótima	1,1
93	214/300	79	F	HU	Resposta Ótima	1,1
94	227/315	44	F	HU	Resposta Ótima	1,0
38	112/333	50	M	HU	Resposta Subótima	2,6
36	153/321	44	F	HU	Resposta Subótima	1,6
39	193/336	46	M	HU	Resposta Subótima	1,5
34	121/305	37	F	IFN	Resposta Subótima	2,4

F: feminino; M: masculino; HU: hidroxiuréia; IFN: interferon- $\alpha$

### **3.2. Obtenção de RNA total para os experimentos de hibridização**

As amostras de RNA total foram avaliadas quanto à integridade conforme descrito na seção 2.5 em Pacientes e Métodos. Os perfis eletroforéticos obtidos de uma das amostras antes e após os procedimentos de tratamento com DNase e purificação estão apresentados na Figura 16.



**Figura 16.** Eletroferograma de RNA total extraído de células mononucleares de sangue periférico de um paciente tratado com IM antes e após o processo de purificação. (A) RNA total não purificado. (B) RNA tratado com DNase I e purificado.

### **3.3. Análises dos dados de expressão**

Após a normalização por quantil (seção 2.9 - Pacientes e Métodos), realizamos a média das réplicas técnicas Cy3 e Cy5 e o método SAM foi aplicado para a identificação de transcritos diferencialmente expressos entre os subgrupos, a partir de análise não pareada e 500 permutações. Para este estudo não foi possível obter listas de transcritos diferencialmente expressos a partir da aplicação do método LOOCV em função da diferença no número de amostras de pacientes responsivos e não responsivos, sendo considerados somente os resultados a partir da análise SAM.

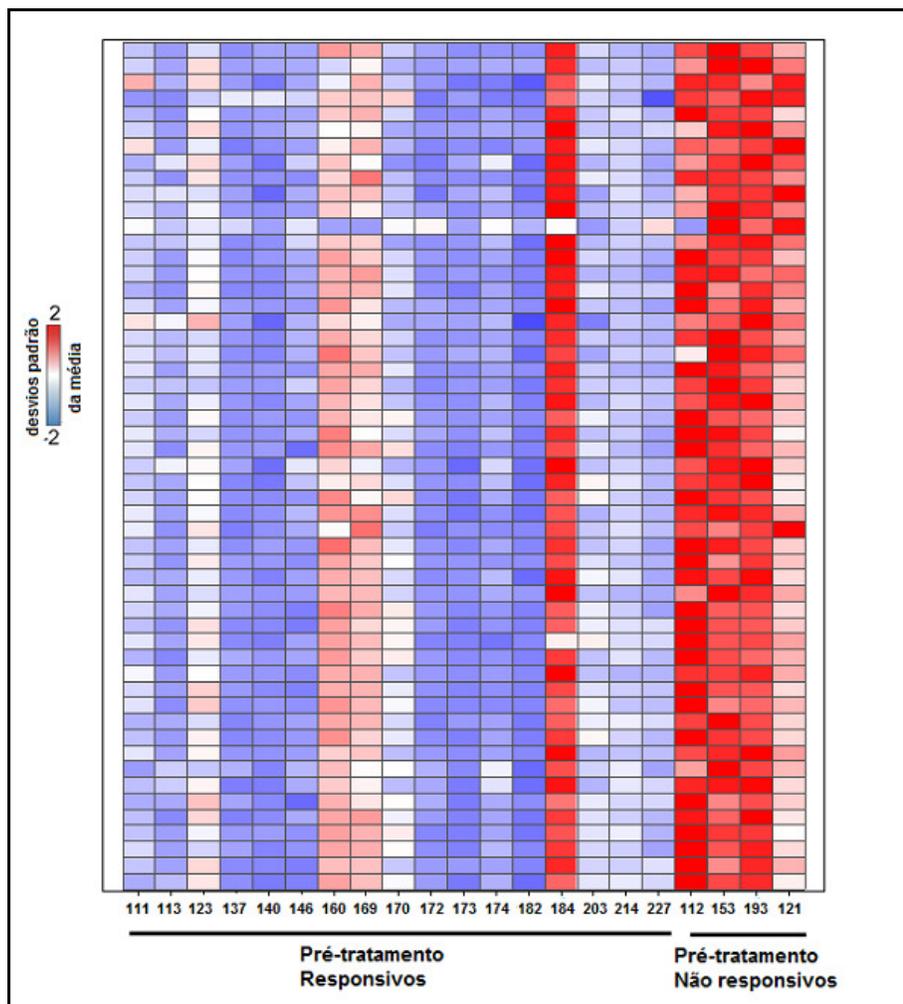
Nosso objetivo foi estudar pacientes tratados com IM para identificar transcritos que pudessem estar envolvidos na resistência citogenética primária ao tratamento. Para isto, foram coletadas amostras de células mononucleares de sangue periférico, pré e pós-tratamento, de pacientes R e NR ao IM. Em razão de ser esperado que a população celular de pacientes responsivos ao tratamento seja predominantemente constituída de células normais, somente três tipos de amostras foram utilizadas para as comparações de perfis de expressão gênica, pré-R, pré-NR e pós-NR.

#### **3.3.1. Subgrupo 1 - Pré-tratamento responsivos *versus* Pré-tratamento de não responsivos**

As análises dos dados de intensidade gerados a partir da plataforma *Whole Human Genome G4112F* foram realizadas a partir de 26.685 *spots* positivos que representaram 24.872 sequências únicas. Identificamos 53 transcritos diferencialmente expressos a partir

dos parâmetros *q-value* máximo < 5% e *fold change* > 2 (Figura 17; Tabela 17). Desse último grupo, somente dois correspondem a genes conhecidos, *RPL26L1* e *TCEAL2*.

O perfil de expressão gênica das amostras pré-tratamento mostrou que todos os transcritos identificados como diferencialmente expressos tiveram expressão aumentada nos NR. Transcritos com expressão diminuída não alcançaram o nível de significância estatística para serem incluídos. Ainda, o perfil gerado não distinguiu as amostras de R e NR. Observamos que alguns pacientes responsivos apresentaram perfis de expressão similares aos não responsivos, particularmente o caso 91 com a amostra n° 184.



**Figura 17.** Perfil de expressão de genes codificadores em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com IM. O heat map mostra 53 genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e não responsivos. Cada linha representa um gene e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um gene em relação à expressão média daquele gene em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um gene em todas as amostras.

**Tabela 17.** Lista dos 53 genes diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de responsivos e não responsivos ao IM.

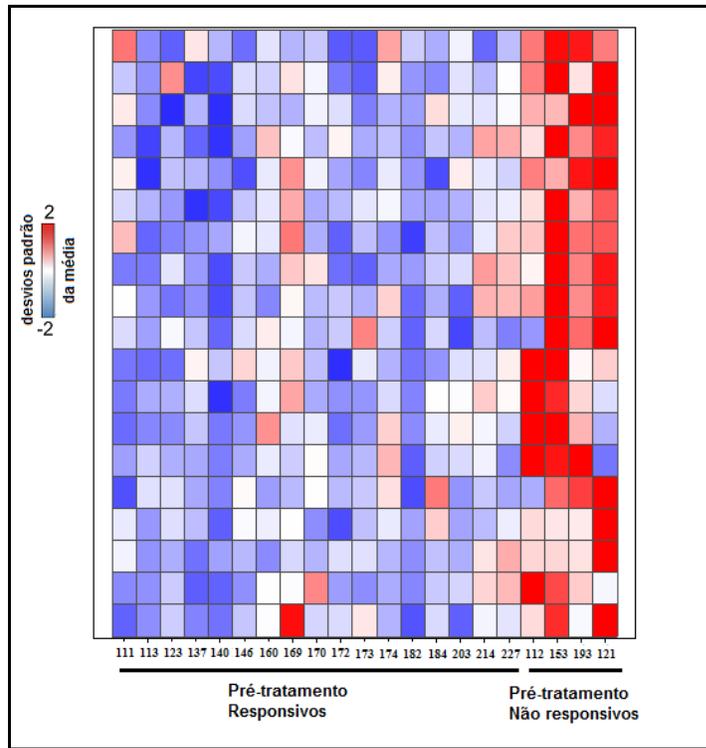
<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
-	A_24_P289043	non-RefSeq gene	4,46	4,74
-	BC031882	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4825811	4,46	4,16
-	A_24_P366465	non-RefSeq gene	4,46	3,86
-	A_24_P392947	non-RefSeq gene	4,46	3,77
-	LOC402251	PREDICTED: Homo sapiens similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (LOC402251), mRNA [XM_377933]	4,46	3,69
-	A_24_P127543	non-RefSeq gene	4,46	3,60
-	A_24_P383802	non-RefSeq gene	4,46	3,55
-	ENST00000356104	non-RefSeq gene	4,46	3,55
-	A_24_P409910	non-RefSeq gene	4,46	3,53
-	A_24_P698816	non-RefSeq gene	4,46	3,52
-	A_24_P631948	non-RefSeq gene	4,46	3,50
-	A_24_P76362	non-RefSeq gene	4,46	3,45
-	A_24_P101211	non-RefSeq gene	4,46	3,43
-	A_24_P161317	non-RefSeq gene	4,46	3,43
-	A_24_P717462	non-RefSeq gene	4,46	3,35
-	A_32_P172198	non-RefSeq gene	4,46	3,32
-	THC2266610	BC007276 HSPA8 protein {Homo sapiens;}, partial (17%) [THC2266610]	4,46	3,27
-	BX118285	BX118285 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGp998G173521, mRNA sequence [BX118285]	4,46	3,14
-	A_24_P807445	non-RefSeq gene	4,46	2,97
-	A_24_P333052	non-RefSeq gene	4,46	2,94

-	A_24_P41662	non-RefSeq gene	4,46	2,92
-	A_23_P125016	non-RefSeq gene	4,46	2,90
-	A_24_P50707	non-RefSeq gene	4,46	2,89
-	A_24_P170186	non-RefSeq gene	4,46	2,88
-	A_24_P392622	non-RefSeq gene	4,46	2,88
-	A_24_P392900	non-RefSeq gene	4,46	2,87
-	ENST00000308118	non-RefSeq gene	4,46	2,80
-	A_24_P237820	non-RefSeq gene	4,46	2,78
-	A_24_P24786	non-RefSeq gene	4,46	2,77
-	A_24_P230388	non-RefSeq gene	4,46	2,69
-	A_24_P521662	non-RefSeq gene	4,46	2,68
51121	RPL26L1	Homo sapiens ribosomal protein L26-like 1 (RPL26L1), mRNA [NM_016093]	4,46	2,66
-	A_24_P843552	non-RefSeq gene	4,46	2,65
-	A_24_P556030	non-RefSeq gene	4,46	2,61
-	A_24_P366768	non-RefSeq gene	4,46	2,60
-	A_24_P409560	non-RefSeq gene	4,46	2,59
-	A_24_P289573	non-RefSeq gene	4,46	2,49
-	A_23_P113811	non-RefSeq gene	4,46	2,47
-	A_24_P273074	non-RefSeq gene	4,46	2,44
-	A_24_P170309	non-RefSeq gene	4,46	2,39
-	A_24_P238896	non-RefSeq gene	4,46	2,38
-	A_24_P464798	non-RefSeq gene	4,46	2,34
-	LOC392506	PREDICTED: Homo sapiens similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (LOC392506), mRNA [XM_926872]	4,46	2,33
-	A_24_P477048	Unknown	4,46	2,31
-	ENST00000305319	PREDICTED: Homo sapiens similar to 40S ribosomal protein S17 (LOC257039), mRNA [XM_172230]	4,46	2,29
-	A_24_P41781	non-RefSeq gene	4,46	2,20

-	BC047952	Homo sapiens, clone IMAGE:5785547, mRNA	4,46	2,18
-	A_24_P418517	non-RefSeq gene	4,46	2,18
-	A_24_P135551	non-RefSeq gene	4,46	2,13
-	A_24_P204664	non-RefSeq gene	4,46	2,13
-	A_24_P246863	non-RefSeq gene	4,46	2,04
140597	TCEAL2	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII)-like 2 (TCEAL2), mRNA [NM_080390]	4,46	2,04
-	A_24_P289984	Unknown	4,46	2,04

\* *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). †*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Valores positivos correspondem a transcritos hiperexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

A partir dos dados de intensidade da plataforma de oligonucleotídeos 44 K desenhada por Nakaya (28) e dos parâmetros *q-value* máximo  $\geq 7,49\%$  e *fold change*  $\geq 1,5$ , foram identificados 19 lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré-R e pré-NR, todos com expressão aumentada nos NR (Figura 18). Dos 19 lncRNAs, 5 são AS-PIN, 8 AS-TIN e 6 S-TIN (Tabela 18). Porém também não foi possível obter um perfil capaz de separar os dois grupos de pacientes.



**Figura 18.** Perfil de expressão de lncRNAs em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com IM. O heat map mostra 19 lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e não responsivos. Cada linha representa um lncRNA e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um lncRNA em relação à expressão média daquele lncRNA em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um lncRNA em todas as amostras.

**Tabela 18.** Lista dos 19 lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de responsivos e não responsivos ao IM.

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe *</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
28992	LRP16	LRP16 protein	S-TIN	7,49	2,08
28514	DLL1	delta-like 1 (Drosophila)	AS-PIN	7,49	2,07
55805	LRP2BP	LRP2 binding protein	AS-TIN	7,49	1,86
7804	LRP8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	AS-TIN	7,49	1,86
157922	CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	AS-TIN	7,49	1,84
23199	KIAA0182	KIAA0182	S-TIN	7,49	1,83
51363	GALNAC4S-6ST	B cell RAG associated protein	AS-TIN	7,49	1,78
3708	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	S-TIN	7,49	1,74
55636	CHD7	chromodomain helicase DNA binding protein 7	AS-PIN	7,49	1,73
23189	ANKRD15	ankyrin repeat domain 15	AS-TIN	7,49	1,70
56675	NRIP3	nuclear receptor interacting protein 3	AS-PIN	7,49	1,65
9896	KIAA0274	KIAA0274	S-TIN	7,49	1,63
25962	KIAA1429	KIAA1429	AS-PIN	7,49	1,62
51700	CYB5R2	cytochrome b5 reductase 2	AS-PIN	7,49	1,61
11343	MGLL	monoglyceride lipase	AS-TIN	8,70	1,57

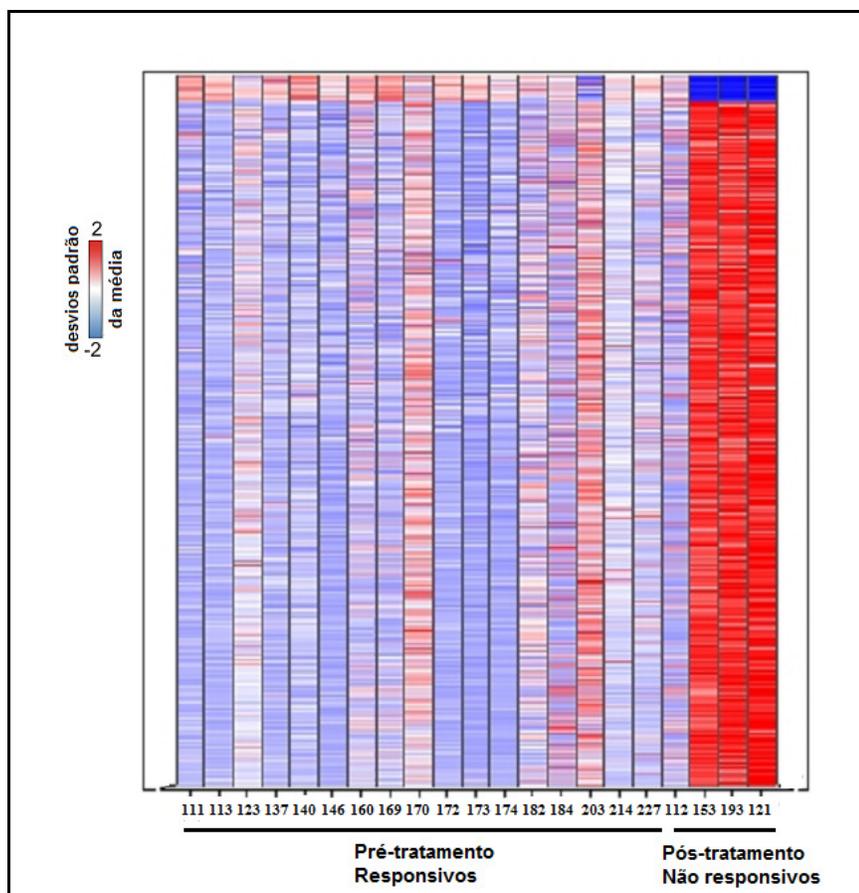
<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe *</b>	<b><i>q-value</i><sup>‡</sup></b>	<b><i>Fold Change</i><sup>§</sup></b>
10460	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	S-TIN	7,49	1,57
9135	RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	S-TIN	7,49	1,53
475	ATOX1	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)	AS-TIN	7,49	1,52
79109	MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	AS-TIN	7,49	1,51

\*Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-TIN, lncRNA totalmente intrônico antissenso; AS-PIN, lncRNA parcialmente intrônico antissenso. <sup>‡</sup>*q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>§</sup>*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Valores positivos correspondem a transcritos hiperexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

### **3.3.2. Subgrupo 2 - Pré-tratamento responsivos *versus* Pós-tratamento de não responsivos**

Para investigar possíveis mecanismos de resistência alterados com o tratamento, comparamos amostras pré-R e pós-NR. Os resultados a partir do uso da plataforma *Whole Human Genome G4112F*, com os parâmetros *q-value* máximo  $< 5$  e *fold change*  $> 2$ , apontaram 797 genes codificadores de proteína como diferencialmente expressos, sendo 767 com expressão aumentada e 30 com expressão diminuída nas amostras pós-NR (Figura 19) (Apêndice 10).

No entanto, apesar da identificação de um grande número de genes, um resultado semelhante ao encontrado para o subgrupo 1 foi também observado, isto é, não houve uma separação completa dos casos R e NR. Apesar destes resultados, optamos por submeter a lista dos genes ao programa IPA, embora as redes gênicas e vias canônicas identificadas tivessem relevância limitada.



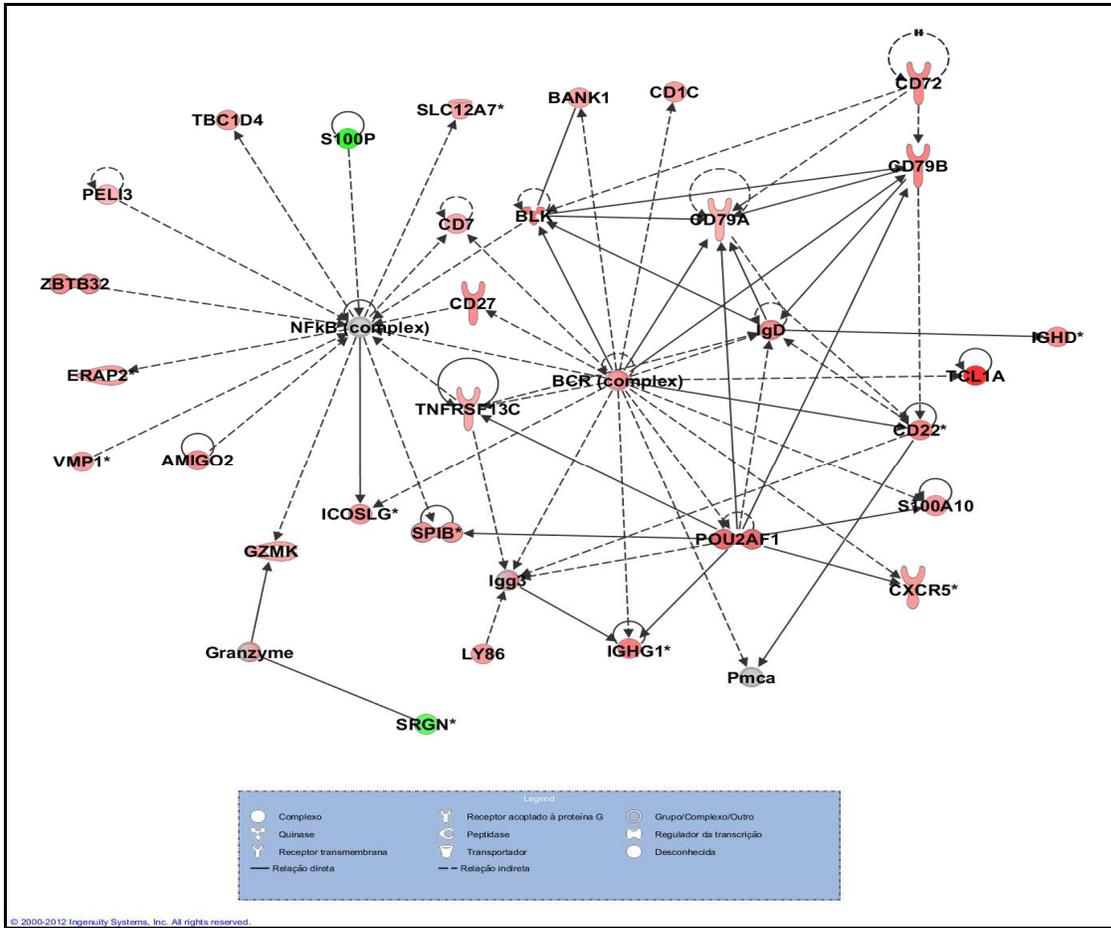
**Figura 19.** Perfil de expressão de genes codificadores em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao IM. O heat map mostra 797 genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre as amostras. Cada linha representa um gene e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um gene em relação à expressão média daquele gene em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um gene em todas as amostras.

A análise funcional apontou 57 funções biológicas significativas, com um alto número de genes em cada categoria, estando muitos associados a múltiplas funções. As cinco mais significativas foram “Desenvolvimento Celular”, “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico”, “Hematopoiese”, “Sinalização e Interação Celular” e “Tráfego de Células do Sistema Imune” (Apêndice 11).

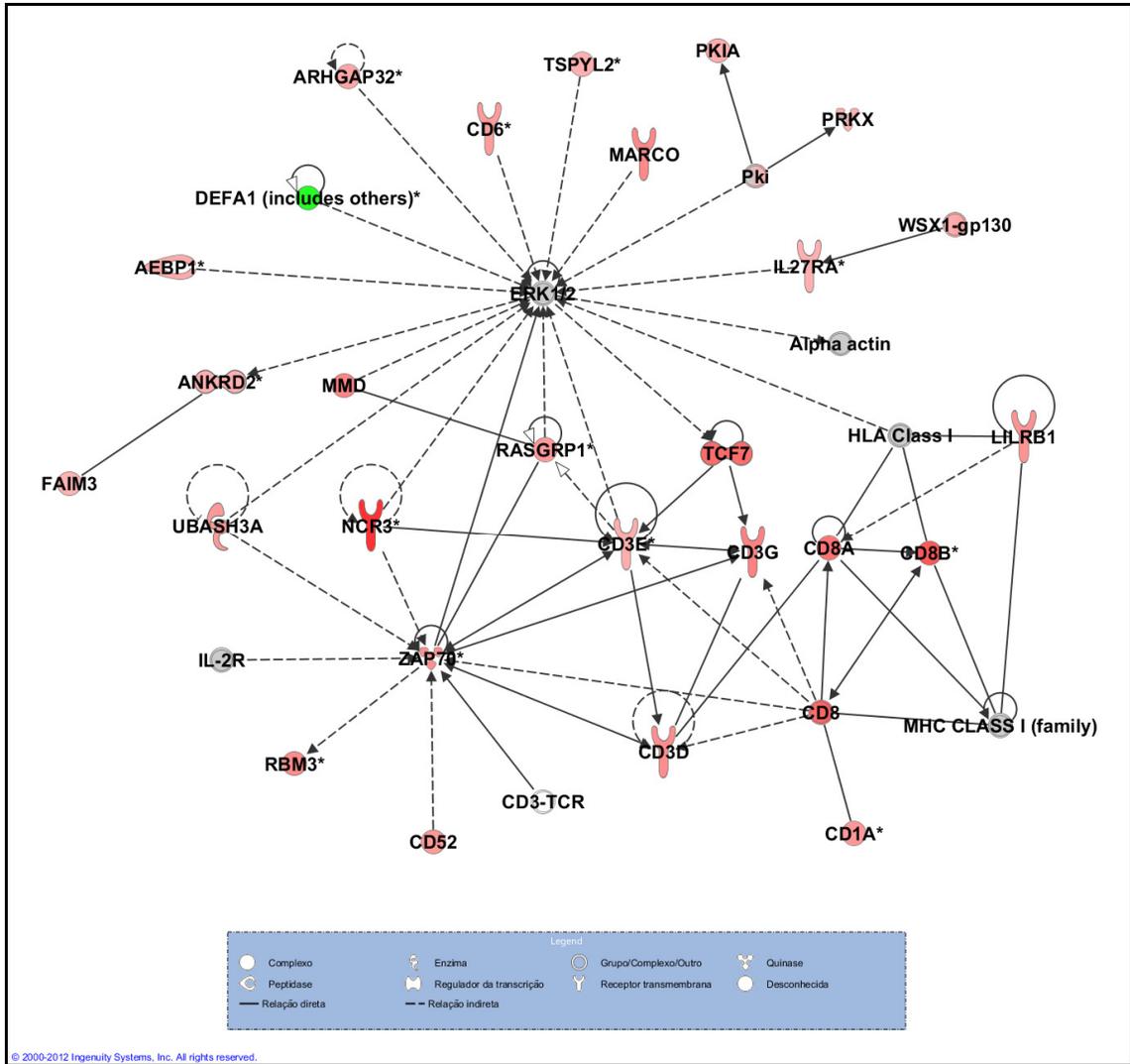
Ainda, os genes diferencialmente expressos foram mapeados em 25 redes gênicas a partir do banco de dados do programa IPA. Este programa ordena os genes por um *score* que define a probabilidade da coleção de genes de número igual ou maior que o presente na rede ter sido obtido ao acaso. Assim, um *score* > 3 indica que há a chance de 1/1000 dos genes que estão na rede terem sido obtidos ao acaso. Todas as 25 redes gênicas identificadas a partir dos genes diferencialmente expressos deste subgrupo tiveram *score* estabelecido pelo programa IPA superior a 14. A rede mais significativa estatisticamente possui genes relacionados às funções “Sinalização e Interação Celular”, “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico” e “Tráfego de Células do Sistema Imune” (Tabela 19, Figura 20). A segunda rede gênica mais significativa é constituída por genes cujas funções estão associadas a “Resposta Imune” “Desenvolvimento Celular” e “Manutenção da Função Celular” (Tabela 19; Figura 21).

**Tabela 19.** As duas redes gênicas mais significativamente enriquecidas com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Redes	Moléculas na rede	Score (-log p-value)	Genes diferencialmente expressos	Funções
1	<p>↑AMIGO2, ↑BANK1, BCR (complex), ↑BLK, ↑CD7, ↑CD22, ↑CD27, ↑CD72, ↑CD1C, ↑CD79A, ↑CD79B, ↑CXCR5, ↑ERAP2, Granzyme, ↑GZMK, ↑ICOSLG, IgD, Igg3, ↑IGHD, ↑IGHG1, ↑LY86, NFkB (complex), ↑PELI3, Pmca, ↑POU2AF1, ↑S100A10, ↓S100P, ↑SLC12A7, ↑SPIB, ↓SRGN, ↑TBC1D4, ↑TCL1A, ↑TNFRSF13C, ↑VMP1, ↑ZBTB32</p>	49	29	<p>Sinalização e Interação Celular, Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico, Tráfego de Células do Sistema Imune</p>
2	<p>↑AEBP1, Alpha actin, ↑ANKRD2, ↑ARHGAP32, ↑CD6, CD8, ↑CD52, ↑CD1A, CD3-TCR, ↑CD3D, ↑CD3E, ↑CD3G, ↑CD8A, ↑CD8B, ↓DEFA1, ERK1/2, ↑FAIM3, HLA Class I, IL-2R, ↑IL27RA, ↑LILRB1, ↑MARCO, MHC CLASS I (family), ↑MMD, ↑NCR3, Pki, ↑PKIA, ↑PRKX, ↑RASGRP1, ↑RBM3, ↑TCF7, ↑TSPYL2, ↑UBASH3A, WSX1-gp130, ↑ZAP70</p>	42	26	<p>Resposta Imune, Desenvolvimento Celular, Manutenção e Função Celular</p>



**Figura 20. Rede gênica mais enriquecida com genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao IM. Genes com expressão aumentada e diminuída em pacientes não responsivos estão respectivamente indicados pelas cores vermelho e verde. Genes presentes no microarranjo que não tiveram alteração de expressão estão em cinza. Relações diretas estão sinalizadas em linhas contínuas e as indiretas em linhas tracejadas.**



**Figura 21. Segunda rede gênica mais enriquecida com genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao IM. Genes com expressão aumentada e diminuída em pacientes não responsivos estão respectivamente indicados pelas cores vermelho e verde. Genes presentes no microarranjo que não tiveram alteração de expressão estão em cinza, enquanto que os ausentes no microarranjo estão em branco. Relações diretas estão sinalizadas em linhas contínuas e as indiretas em linhas tracejadas.**

Ainda, 29 vias canônicas foram identificadas como significativamente enriquecidas ( $p < 0,05$ ;  $-\log p > 1.3$ ), sendo as três primeiras: “Apoptose de células alvo mediada por linfócitos T citotóxicos”, “Desenvolvimento de células B” e “Sinalização i-COS-iCOSL em células T auxiliares” (Figura 22).

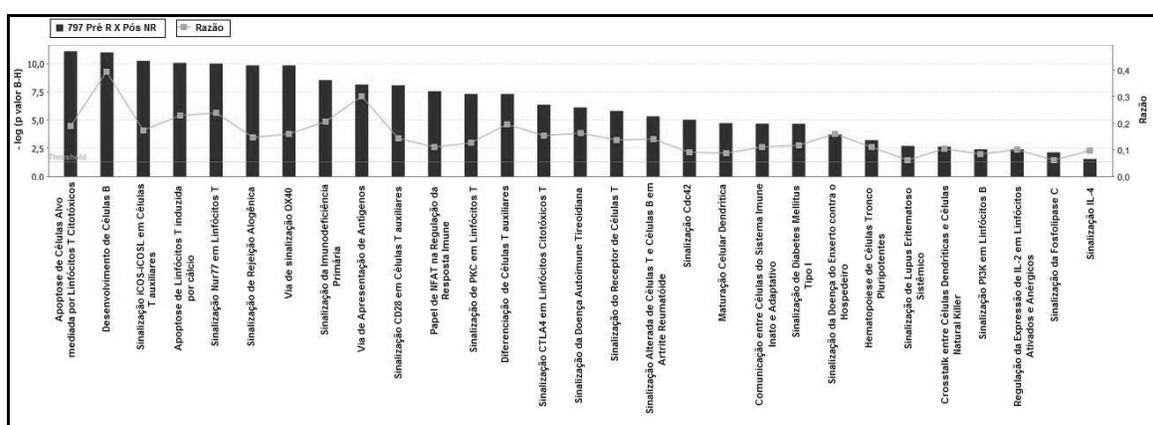
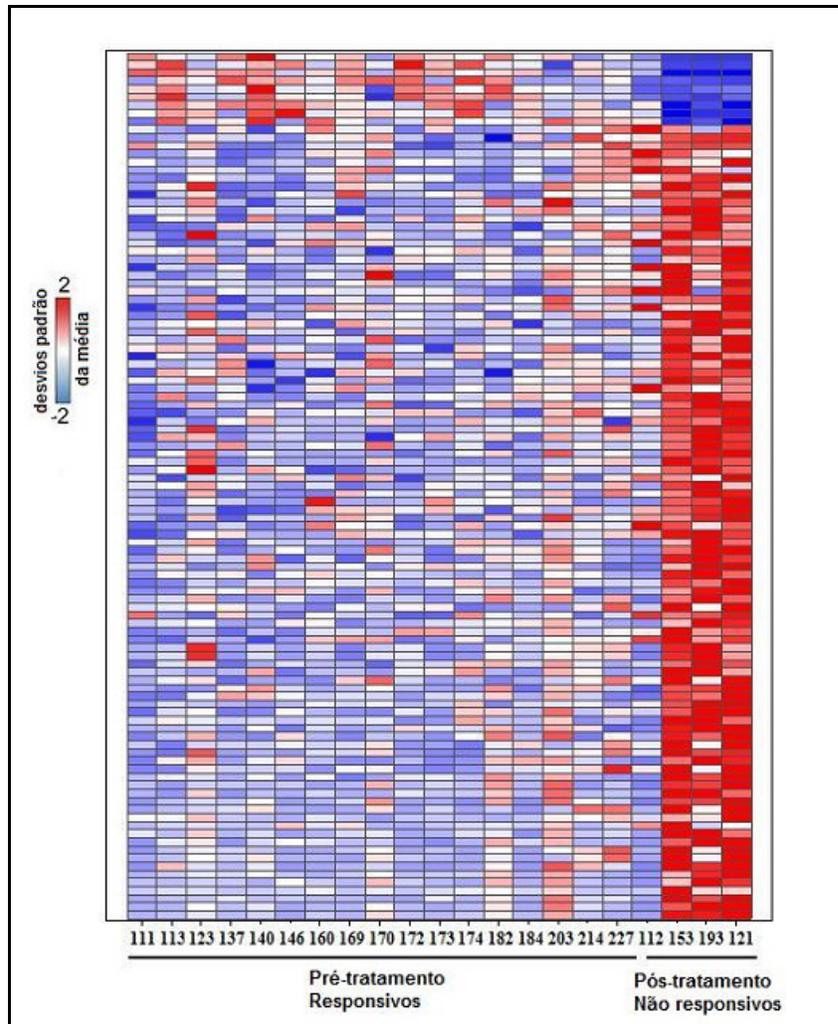


Figura 22. Vias canônicas identificadas pelo programa *Ingenuity Pathway Analysis* como significativamente enriquecidas ( $-\log p > 1,3$ ; isto é,  $p < 0,05$ ) com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM.

A partir da plataforma combinada intrônica-exônica e dos parâmetros  $q$ -value máximo  $< 10\%$  e  $fold\ change \geq 1,5$ , identificamos 107 lncRNAs como diferencialmente expressos entre amostras pré-R e pós-NR, sendo 98 com expressão aumentada e 9 com expressão diminuída nos NR (Figura 23; Apêndice 12). Porém, o perfil encontrado também não separou R e NR.

Apesar destes resultados, submetemos ao programa IPA a lista dos genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs intrônicos identificados como diferencialmente expressos. Dezenove funções foram encontradas como significativamente enriquecidas ( $p < 0.05$ ), sendo as três primeiras: “Movimento Celular”, “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico” e “Tráfego de Células do Sistema Imune” (Tabela 20). A partir dos genes dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos foram identificadas 7 redes gênicas; as duas mais significativas estão na Tabela 21. O programa IPA não identificou vias canônicas significativamente enriquecidas para este grupo de transcritos.



**Figura 23. Perfil de expressão de lncRNAs em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao IM.** O heat map mostra 107 lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras. Cada linha representa um lncRNA e cada coluna representa uma amostra cuja identificação está indicada abaixo. As cores indicam aumento (vermelho) ou diminuição (azul) da expressão de um lncRNA em relação à expressão média daquele lncRNA em todos os pacientes; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio da expressão de um lncRNA em todas as amostras.

**Tabela 20.** As três funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
Movimento Celular	↑ACTN4, ↑ALB, ↑C3, ↑CBLB, ↑CD74, ↑CD44 (includes EG:100330801), ↑EPAS1, ↑LGALS1, ↓MAPK14, ↑NCAM1 ↑PDE4D, ↑PXN, ↓S100A8	2,92E-02 - 1,09E-01	13
Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico	↑ACTN4, AKAP13, ↑ALB, ↑BCL2, ↑C3, ↑CBLB, ↑CD74, ↑CD44 (includes EG:100330801), ↑CHD7, ↑CTCF (includes EG:10664), ↑DLL1, ↑EPAS1, ↓ERG, ↑KLF13, ↑LGALS1, ↓MAPK14, ↑PDE4D, ↑PPAP2A, ↑PSEN1, ↑PXN, ↑RFTN1, ↓S100A8, ↑TACC3	2,92E-02 - 1,09E-01	23
Tráfego de Células do Sistema Imune	↑ACTN4, ↑ALB, ↑BCL2, ↑C3, ↑CBLB, ↑CD74, ↑CD44 (includes EG:100330801), ↑DLL1, ↑EPAS1, ↓ERG, ↑LGALS1, ↓MAPK14, ↑PDE4D, ↑PXN, ↓S100A8	2,92E-02 - 1,09E-01	15

\*p-valor corrigido pelo múltiplo teste Benjamini-Hochberg

**Tabela 21.** As duas redes mais significativamente enriquecidas para os genes codificadores de proteína dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

<b>Redes</b>	<b>Moléculas na rede</b>	<b>Score (- log p- value)</b>	<b>Genes diferenci- almente expressos</b>	<b>Funções</b>
1	14-3-3, ↑AKAP13, ↑BCL2, Calcineurin protein(s), ↑CAMK2D, CaMKII, ↑CBLB, ↑CD74, ↑CHD7, ↑CTCF (includes EG:10664), Cytochrome c, ↑DOCK10, ↑EXOC3, Fcer1, HLA-DQ, HLA-DR, ↑ITPR1, ITPR, ↑LBH, MAP2K1/2, ↑NCAM1, Nfat (family), NFkB (complex), ↑NMT2, ↑NOSIP, ↑PCSK7, PP1 protein complex group, PP2A, ↑PPAP2A, Ppp2c, ↑RFTN1, Rxr, ↑SENP2, Spectrin, ↑STK39	35	19	Morte Celular, Organização Celular e Sinalização Celular
2	↑AFF3, ↑ANK3, ARHGAP9, ↑ARHGAP10, ↑ARL15, ATRX, C15orf39, C5orf54, C9orf100, ↑CNOT1, CNOT4, ↑CYB5R1, FRG1, ↑KIAA0182, ↑KIAA1377, LRRC41, ↑LSM6 (includes EG:11157), NPM3, ODF2L, ↑PCGF5, ↑PSMA1, ↑RBPMS, RMND5B, RNF123, RNF220, ↑SARNP, ↑SEPT2, ↑SEPT6, STAU2, TRIM17, ↑TRIM44, UBC, ↓UBE2W, ZFAND2A, ZFAND2B	34	17	Modificação Pós-Traducional, Morfologia Celular, Sinalização e Interação Celular

Embora genes codificadores de proteína e lncRNAs tenham sido identificados como diferencialmente expressos a partir de plataformas diferentes, pudemos observar alterações na expressão de alguns transcritos codificadores e lncRNAs de mesmo *locus* gênico. Quanto ao padrão de expressão, os transcritos de cada par tiveram modificações para o mesmo lado, isto é, ambos aumentados ou diminuídos (Tabela 22).

**Tabela 22.** Padrões de expressão dos pares lncRNA e gene codificador de mesmo *locus* em amostras pós-tratamento de pacientes não responsivos em relação a amostras pré-tratamento de pacientes responsivos ao IM.

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do Gene</b>	<b>Tipo de sonda</b>	<b>Padrão de expressão do TIN - pacientes NR</b>	<b>Padrão de expressão do gene codificador - pacientes NR</b>
288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	S-TIN	umentado	umentado
596	BCL2	B-cell LL/lymphoma 2	S-TIN	umentado	umentado
817	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	S-TIN	umentado	umentado
55619	DOCK10	dedicator of cytokinesis 10	S-TIN	umentado	umentado
115350	FCRL1	Fc receptor-like 1	S-TIN	umentado	umentado
81606	LBH	limb bud and heart development homolog (mouse)	S-TIN	umentado	umentado
1432	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	S-TIN	diminuído	diminuído

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do Gene</b>	<b>Tipo de sonda</b>	<b>Padrão de expressão do TIN - pacientes NR</b>	<b>Padrão de expressão do gene codificador - pacientes NR</b>
9397	NMT2	N-myristoyltransferase 2	S-TIN	aumentado	aumentado
26751	SH3YL1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1 (S. cerevisiae)	S-TIN	aumentado	aumentado
170463	SSBP4	single stranded DNA binding protein 4	S-TIN	aumentado	aumentado
11238	CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	AS-TIN	aumentado	aumentado
11010	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	AS-TIN	aumentado	aumentado

NR: não responsivos; S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-TIN, lncRNA totalmente intrônico antissenso.

### **3.3.3. Subgrupo 3 - Pré-tratamento de não responsivos *versus* Pós-tratamento de não responsivos**

As amostras pré-NR e pós-NR foram comparadas com o intuito de identificar genes potencialmente ligados ao desenvolvimento de resistência exclusivamente no decorrer do tratamento nestes pacientes. Porém, os resultados obtidos pelo uso da plataforma *Human Genome G4112F* mostraram somente um gene como diferencialmente expresso entre as amostras. *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) foi encontrado com aumento da expressão em 1,23 vezes (*q-value* = 0) nas amostras pós-tratamento em relação ao pré-tratamento.

A análise da plataforma customizada não revelou lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras dos pacientes não responsivos.



*Discussão*

---



Neste trabalho inicialmente pesquisamos a presença de mutações no domínio quinásico do gene *BCR-ABL* em pacientes com LMC resistentes ao tratamento com TKIs.

A presença de mutações é o mecanismo mais associado ao fenótipo de resistência aos TKIs utilizados no tratamento da LMC. O *status* mutacional de um paciente é uma ferramenta muito útil no contexto clínico e importante na estratégia terapêutica a ser adotada, como aumento de dose, troca para TKIs de segunda geração, indicação para TCTH ou pesquisas de novos fármacos (28).

Neste estudo foram incluídos pacientes que tiveram amostras coletadas durante o uso do IM (n = 50), pacientes com coleta após suspensão do IM (n = 20) e um paciente tratado com nilotinibe em primeira linha. No total, mutações foram observadas em 37% (26/71) dos pacientes resistentes aos tratamentos com TKIs.

Dos pacientes que tiveram amostras coletadas para pesquisa de mutações durante a terapia com IM, 17/50 (34%) foram tratados em primeira linha. Mutações foram identificadas em 4/9 (44%) e em 0/6 (0%) dos pacientes, respectivamente, com falha e resposta subótima. A estimativa de mutações atribuída a pacientes com falha é de 29%, embora haja diferenças na incidência de mutações entre pacientes com resistência primária ou secundária (28). Particularmente esta diferença foi observada em um estudo em que a maioria das mutações foi identificada em pacientes que haviam perdido RH ou RCC (97). No nosso trabalho, os 4 pacientes com falha de resposta e que apresentaram mutações tiveram perda de RH ou RC. Em relação aos respondedores subótimos, foi demonstrado que estes pacientes representam um grupo heterogêneo e com prognóstico variado, dependendo de qual fase do tratamento a resposta é avaliada (98). A frequência de mutações encontrada para estes casos variou entre 5-14% (97, 99).

As mutações que afetam os resíduos T315, Y253, E255, M351, G250, F359 e H396 foram encontradas com maior frequência em estudos envolvendo casos resistentes ao IM, totalizando 66% (14). Quando considerados somente os casos avaliados após resistência ao IM, observamos que 50% (14/28) das mutações estavam localizadas nestes resíduos.

Pacientes com a mutação T315I constituem um dos maiores desafios terapêuticos, pois sua detecção é um marcador de falha com IM, dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe (18). A T315I confere maior resistência em função de uma combinação de fatores, entre eles, ocorrência de bloqueio estérico e perda da ponte de hidrogênio impedindo a ligação com os inibidores, aumento da atividade intrínseca da quinase e fosforilação aberrante dos substratos (100, 101). Recentemente, estudos clínicos de fase II com ponatinibe apontaram resultados promissores para pacientes em FC com a mutação T315I (53). No nosso trabalho, a mutação T315I foi identificada em 7 pacientes, 3 durante o tratamento com IM, 3 durante dasatinibe e 1 após 11 meses de suspensão de IM. Durante o tratamento com IM, a frequência da T315I foi de 15% (3/20), valor semelhante ao relatado por outros estudos (14, 102). A partir da data da coleta das amostras para pesquisa de mutações, os casos portadores desta mutação tiveram a menor SG (43%) em comparação aos pacientes com as demais mutações ( $p = 0,04$ ).

Uma sobrevida mais curta também foi observada para os pacientes com mutações localizadas na região *P-loop*. No entanto, vale ressaltar que as análises de sobrevida foram realizadas a partir da data de coleta das amostras e que a maioria dos pacientes (5/8) estava em FA/CB neste momento. Destacamos também que alguns destes pacientes não tiveram acesso a TKIs de segunda geração, o que pode ter contribuído para uma sobrevida mais curta. No nosso estudo, os casos com mutações e que foram tratados com dasatinibe e/ou

nilotinibe apresentaram uma maior SG em relação aos não tratados com esses inibidores ( $p = 0,006$ ).

Um pior prognóstico para pacientes com mutações *P-loop* foi observado por vários estudos (13, 30, 32). Por outro lado, um estudo realizado por Jabbour et al. (103) com pacientes em remissão citogenética e falha em alcançar RMM não associou um pior prognóstico para os casos com mutações nesta região. Porém, os autores incluíram pacientes com a mutação T315I no mesmo grupo das demais mutações, o que pode ter desfavorecido as taxas de sobrevida deste último grupo. Adicionalmente, os pacientes foram tratados com inibidores de segunda geração após falha com IM, diferentemente dos outros estudos.

Um número menor de mutações está associado à resistência ao tratamento com TKIs de segunda geração quando comparado ao de mutações relacionadas à resistência ao IM. Relatos clínicos têm confirmado em sua maioria os achados de testes de resistência *in vitro* em relação aos tipos de mutações que permanecem sensíveis aos TKIs de segunda geração. As mutações T315I/A, F317L/I/V/C e V299L têm sido associadas à diminuição da eficácia clínica ao dasatinibe e T315I, Y253H, E255K/V, F359V/C ao nilotinibe (35). No nosso estudo, o paciente portador da mutação F317L (caso 3) foi tratado com dasatinibe após suspensão do IM, mas apresentou intolerância; com nilotinibe atualmente apresenta RCC. Os pacientes com as mutações E255V (caso 10) e Y253H (caso 12) fizeram uso de nilotinibe logo após IM, mas apresentaram resistência. Houve perda de seguimento para o caso 10 e o caso 12 está sendo tratado com HU após falha com dasatinibe. Outros dois pacientes com mutações envolvendo os mesmos aminoácidos (casos 7 e 56) que fizeram uso de dasatinibe após IM atualmente mantêm este tratamento.

Ainda, a mutação T315I foi identificada em um paciente (caso 17) após 3 meses de tratamento com dasatinibe. Na mesma amostra também foi detectada a mutação M351T, anteriormente observada durante a falha com IM. Soverini et al. (104) relataram que a mutação T315I foi a mais frequente entre as que surgiram e levaram à recaída durante o tratamento com dasatinibe ou nilotinibe. Estes autores ainda ressaltam que pacientes resistentes ao IM têm uma maior probabilidade de desenvolver mutações adicionais sob a pressão seletiva de novos TKIs. A instabilidade genética nesses casos pode levar ao aparecimento de múltiplas mutações no mesmo clone ou em outros, que são selecionadas dependendo do TKI utilizado (45, 104).

O sequenciamento direto permanece sendo o método recomendado para a análise de mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* na rotina clínica laboratorial, apesar do seu limite de sensibilidade entre 10-20%. É recomendado atualmente que a pesquisa de mutações seja realizada ao diagnóstico somente em pacientes em FA/CB. Pacientes tratados em primeira linha com IM e que apresentarem resposta subótima, falha ou aumento dos níveis de transcritos com perda da RMM também devem ser analisados, da mesma forma que pacientes tratados em segunda linha com dasatinibe e nilotinibe que tiverem falha hematológica ou citogenética (28).

O uso de métodos de alta sensibilidade para detecção de mutações em pacientes em FC ao diagnóstico ou em pacientes com RCC durante IM foi amplamente discutido, principalmente com relação ao impacto clínico. Um dos estudos que ilustra esta questão, realizado com pacientes ao diagnóstico a partir do emprego de uma técnica de alta sensibilidade, não mostrou correlação entre a presença de mutações e a falha com IM (105). No entanto, mais recentemente, a tecnologia de espectrometria de massa

(sensibilidade de 0,05% a 0,5%) foi utilizada para a identificação de mutações *BCR-ABL* em pacientes resistentes ao IM, porém antes do uso de TKIs de segunda geração. Os autores demonstraram que a presença de clones em baixos níveis com mutações que conferiam resistência ao TKI utilizado como segunda linha foi altamente preditiva de falha do tratamento (106).

No nosso estudo, 63% (45/71) dos pacientes resistentes avaliados não tiveram mutações identificadas no domínio quinásico *BCR-ABL*. Nesta população, 18% (8/45) apresentaram evolução clonal, outro mecanismo conhecido de resistência. Além dessas duas causas, vários mecanismos têm sido associados ao fenômeno de resistência ao IM, como a ativação de vias alternativas de transdução de sinais (25, 26).

Tendo em vista que a resistência ao tratamento com TKIs é um processo multifatorial, procuramos identificar na segunda parte deste trabalho, genes codificadores de proteína e lncRNAs diferencialmente expressos entre pacientes responsivos e resistentes ao IM ou ao dasatinibe que potencialmente possam auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos de resistência a estes TKIs.

No estudo de expressão gênica envolvendo **dasatinibe**, dois dos quatro pacientes que não foram responsivos à terapia apresentaram as mutações F317L e G250E no domínio quinásico *BCR-ABL*. A mutação F317L tem sido detectada mais frequentemente após o tratamento com dasatinibe e associada à resistência (46, 107). Porém, como neste estudo foram considerados somente os transcritos que apareceram em 100% das listas identificadas pelos métodos SAM e LOOCV, os resultados apresentados são referentes aos transcritos comuns a todos os pacientes, com ou sem mutações.

Entre as amostras pré-R e pré-NR foram identificados cinco genes diferencialmente expressos. Dois deles, *TARP* (TCR gamma alternate reading frame protein) e *ALOX15B* (15-Lipoxygenase 2) foram descritos com expressão alterada em células de câncer de próstata (108, 109). Um dos dois lncRNAs senso identificados como diferencialmente expressos entre amostras pré-R e pré-NR mapeia no *locus* genômico de *MYLIP*, um potencial supressor tumoral em leucemias. *MYLIP* é alvo do *cluster* miR-106-363, cujo aumento de expressão foi encontrado em leucemia de células T (110). O número baixo de transcritos diferencialmente expressos identificados entre as amostras pré-tratamento sugere inicialmente certa homogeneidade no perfil de expressão gênica das amostras coletadas nesta situação, porém o número reduzido de pacientes incluídos neste estudo provavelmente seja o fator preponderante desta pequena diferença observada.

Além dos transcritos diferencialmente expressos exclusivos citados acima, 11 genes codificadores de proteína e 3 lncRNAs foram identificados em comum entre pré-R *versus* pré-NR (subgrupo 1) e pré-R *versus* pós-NR (subgrupo 2). Um dos genes, *PAWR* (*PAR-4*), com expressão diminuída nos NR, é um supressor tumoral e foi identificado com expressão diminuída em uma variedade de tumores, incluindo LLA e LLC (111). Este gene codifica uma proteína pró-apoptótica que ativa os componentes moleculares da maquinaria de morte celular, inibindo os fatores de sobrevivência celular. Em células de linhagens hematopoiéticas, a expressão de *PAWR/PAR-4* impediu a transformação causada por p185<sup>BCR-ABL</sup> (112).

Em seguida, comparamos as amostras pré-R e pós-NR (subgrupo 2) para identificarmos possíveis transcritos relacionados ao surgimento de resistência durante o tratamento. Entre os genes com expressão aumentada nos pacientes resistentes ao

dasatinibe, está *ABCF2*, um membro da superfamília de ligantes de ATP. De fato, o efluxo de drogas mediado pelos transportadores ABC é um conhecido mecanismo de resistência. *ABCF2* foi identificado com expressão aumentada em amostras de pacientes com câncer de ovário e resistentes ao tratamento quimioterápico (113). Ainda, níveis de proteína foram significativamente mais altos nos pacientes não responsivos em relação aos responsivos à quimioterapia no tratamento de câncer de ovário de células claras (114).

O uso do programa IPA revelou muitas funções biológicas enriquecidas com transcritos diferencialmente expressos entre as amostras deste subgrupo. Genes envolvidos no processo de adesão celular e identificados na categoria “Sinalização e Interação Celular” foram os mais frequentes (26/41 genes;  $p = 1,94E-03$ ). Genes relacionados a esta função também foram identificados e incluídos em assinaturas de expressão gênica associadas à resistência citogenética primária ao IM (63, 115, 116). Particularmente detectamos a expressão diminuída do gene *THBS1* relacionado à agregação plaquetária e de outros dois genes, *THBD* e *TFPI* cujos produtos estão envolvidos no processo de coagulação. De fato, sangramento é um dos efeitos adversos observados em pacientes tratados com dasatinibe. Uma associação entre dasatinibe e disfunção na homeostase primária foi recentemente mostrada (117). Eventos adversos estão correlacionados com efeitos *off-target*, os quais são efeitos mediados por outros mecanismos que não os pressumidos da ação medicamentosa. Muitos inibidores de quinases possuem atividade *off-target* (118). A partir destas observações é concebível que parte dos genes e lncRNAs identificados neste subgrupo possa ser regulada por estes efeitos.

Para as análises funcionais envolvendo lncRNAs, consideramos o gene codificador de proteína hospedado no mesmo *locus* do qual um lncRNA diferencialmente expresso foi

detectado. Estas análises são feitas assumindo que um lncRNA pode regular o gene codificador em cis, isto é, afetando processos como *splicing* alternativo, transporte e tradução da mensagem codificadora de proteína (69, 119) ou ainda alterando a expressão de outros genes envolvidos em suas vias de sinalização.

A função mais enriquecida identificada pelo programa IPA a partir dos genes dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos na comparação pré-R e pós-NR foi “Morte Celular”. De fato, a inibição da apoptose é um dos mecanismos envolvidos na patogênese da LMC, além da diminuição da adesão celular de progenitores hematopoiéticos imaturos ao microambiente da medula óssea e sinalização mitogênica constitutivamente ativa (120). Entre os transcritos identificados na categoria “Morte Celular”, o lncRNA antissenso do *locus* gênico *CD44* foi encontrado com expressão aumentada em pacientes não responsivos ao dasatinibe. O gene codificador de proteína correspondente a esse lncRNA foi identificado com expressão aumentada em linhagens celulares resistentes ao IM e PD166326 (121). Ainda nesta mesma categoria foram identificados *ncTNFAIP8* e *ncFOXO3A*, porém com expressão diminuída nos NR. A expressão diminuída de *TNFAIP8* foi relatada em pacientes com LMA resistentes à quimioterapia em relação aos que alcançaram remissão completa (122). Proteínas FOXO3 estão envolvidas em diversos processos como ciclo celular, apoptose e diferenciação. Estudos empregando linhagens celulares expressando *BCR-ABL* mostraram que *BCR-ABL* promove a supressão de FOXO3A através da sinalização de AKT, levando à saída de FOXO3A do núcleo e sua proteólise no citoplasma. Já a inibição de *BCR-ABL* pela ação do imatinibe resultou no acúmulo de FOXO3A e indução da transcrição da molécula pró-apoptótica BIM (123, 124).

“Morte Celular” foi também identificada pelo programa IPA como significativamente enriquecida com genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre pré-NR e pós-NR. Dois genes identificados nesta categoria, *IFNG* e *FASLG* foram incluídos em um estudo que associou diversos SNPs com resposta ao IM (125). A expressão aumentada de outro gene, *AKT1*, em pacientes não responsivos após o tratamento sugere que a reativação da via da quinase PI3, uma das múltiplas vias de sinalização induzida por BCR-ABL que leva à proliferação celular e à supressão da apoptose (120, 126). Em acordo com esse achado, a quinase AKT foi encontrada ativada em células K562 resistentes ao IM e ao dasatinibe (127).

Muitas redes gênicas foram identificadas como significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos nos NR pós-tratamento em relação ao pré-tratamento de R e NR. Em ambas as análises, a função biológica “Sinalização e Interação Celular” foi incluída nas redes mais significativamente enriquecidas (Tabelas 9 e 14). Da mesma forma, análises considerando os genes codificadores dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos revelaram que genes relacionados com a categoria “Câncer” estavam incluídos nas redes mais significativas (Tabelas 11 e 15).

Vários estudos mostraram que vias biológicas importantes estão desreguladas em pacientes com resistência citogenética primária ao IM por processos envolvendo mecanismos dependentes e independentes de BCR-ABL (62, 63, 116). Como IM e dasatinibe afetam comumente vias moleculares que regulam importantes processos celulares, segundo demonstrado em um estudo comparativo de perfis de expressão gênica de células da linhagem K562 tratadas com estes dois TKIs (128), a resistência ao

dasatinibe parece ocorrer de forma semelhante à observada ao IM, envolvendo uma diversidade de genes biologicamente relevantes.

Com relação ao estudo de expressão gênica envolvendo o **IM**, os perfis de expressão gênica obtidos a partir do uso das plataformas *Whole Human Genome G4112F* e customizada intrônica-exônica tiveram valor limitante em distinguir consistentemente as amostras de pacientes R e NR. Primeiramente, neste estudo, 17 pacientes foram classificados como R e apenas 4 como NR, constituindo dois grupos muito discrepantes em relação ao número de amostras. Em segundo lugar, os pacientes classificados como NR foram assim considerados por apresentarem resposta subótima avaliada aos 12 meses de tratamento e no momento da coleta pós-tratamento. Aos 12 meses de tratamento, os 4 pacientes apresentavam RCP, enquanto no momento da coleta pós-tratamento permaneceram classificados como respondedores subótimos por não terem alcançado RMM. Vários estudos foram realizados com o intuito de identificar assinaturas gênicas relacionadas à resposta citogenética através da metodologia de microarranjos (60, 62, 63, 115, 116). Estes estudos diferiram quanto ao tipo de amostra utilizada (sangue periférico, leucócitos totais ou células mononucleares), bem como de plataforma de microarranjo utilizada. No entanto, a principal diferença do nosso trabalho está na classificação dos pacientes com resposta subótima como NR. Segundo Alvarado et al. (98) respondedores subótimos representam um grupo heterogêneo com prognóstico variado; pacientes avaliados aos 6 meses tiveram uma evolução similar aos pacientes com falha, enquanto os avaliados aos 18 meses mostraram uma evolução similar aos com resposta ótima. No nosso trabalho, observamos que os pacientes que apresentaram resposta subótima alcançaram

RCC (4/4) e RMM (3/4) com IM após um tempo maior do que o proposto pela LeukemiaNet, ou seja, foram respondedores tardios.

Um grande número de genes codificadores de proteína e lncRNAs diferencialmente expressos foi encontrado no subgrupo comparativo entre amostras pré-R e pós-NR. Porém, o perfil de expressão dos 797 genes codificadores não distinguiu claramente pacientes R e NR. Apesar deste resultado, optamos por submeter a lista dos genes codificadores ao programa IPA, embora as redes gênicas e vias canônicas identificadas tivessem relevância limitada. Muitos genes foram associados concomitantemente a múltiplas categorias funcionais pelo programa IPA. Dentre eles, ressaltamos *LEF1*, *IL7R*, *BCL2* e *FYN*, associados às funções “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematopoiético” e “Hematopoiese” e que foram descritos em estudos relacionados à progressão da LMC e à resistência ao IM.

Jamieson et al. (129) observaram que células progenitoras de granulócitos e macrófagos de pacientes com LMC em crise blástica apresentaram altos níveis de expressão de *LEF-1*. Concordantemente, ao investigarem a sinalização celular envolvida na progressão da LMC, Sengupta et al. (130) também identificaram expressão aumentada de *LEF1* e incluíram este gene em um conjunto de transcritos com expressão alterada em células CD34+ capaz de distinguir fase crônica e crise blástica em LMC. *IL7-R* foi identificado por Villuendas e colaboradores (63) em um grupo de seis genes correlacionados com a probabilidade de falha do tratamento com IM. A expressão de *IL7-R* foi identificada como aumentada em amostras pré-tratamento de pacientes que foram considerados resistentes após seis meses de tratamento. Em nosso estudo observamos também expressão aumentada de *IL7-R* em NR, porém em amostras pós-tratamento.

Ainda, encontramos a expressão aumentada de *BCL2*, que ao ser induzida pela atividade de BCR/ABL ocasiona a inibição da apoptose (131, 132). Neste trabalho também identificamos a expressão aumentada nos NR de *ncBCL-2*, transcrito totalmente intrônico expresso no sentido senso (S-TIN).

A atividade de BCR/ABL também estimula a proliferação celular através da fosforilação de numerosos substratos, entre eles, vários membros da família Src. A expressão de *FYN* (*FYN oncogene related to SRC, FGR, YES*) foi identificada em um grupo de pacientes que recaiu após o uso de IM (61) ao passo que o silenciamento de *FYN* por RNA de interferência levou ao aumento da sensibilidade a esse composto (133).

Com relação às redes gênicas identificadas a partir do mapeamento dos genes codificadores de proteína diferencialmente expressos ainda neste subgrupo (pré-R e pós-NR), destacamos a presença de NF- $\kappa$ B, fator de transcrição ativado por BCR-ABL e envolvido na transformação celular e formação tumoral (134, 135). *NF- $\kappa$ B* não foi identificado como diferencialmente expresso, porém foi mapeado na primeira rede gênica mais enriquecida como ponto central de interação entre outros genes identificados como alterados e que são descritos em estudos relacionados a várias desordens hematológicas. Um deles, o fator de transcrição *SPI-B*, possui relação direta com *POU2AF1*, cuja expressão aumentada foi encontrada em linfoma de células B (136).

Alguns genes componentes da segunda rede gênica estão envolvidos nas vias de sinalização desencadeadas pela atividade oncogênica de BCR-ABL. RICS (*Rho GTPase-activating protein*) também denominada ARHGAP32, foi identificada por Zhao et al. (137) ao investigarem novas moléculas que interagem com as proteínas adaptadoras GAB. Particularmente, a proteína GAB2 é componente do sistema de transdução de sinais que

envolvem citocinas, fatores de crescimento e receptores de antígenos. O complexo GAB2-GRB2 foi identificado como um forte mediador da sinalização celular desencadeada pela auto-fosforilação de BCR-ABL em células Ba/F3 murinas (138). Ainda destacamos o gene *CD52*, identificado com expressão aumentada em células CD34+ Ph+ de pacientes em crise blástica em relação a células de pacientes recém-diagnosticados em fase crônica de LMC, sendo considerado um possível marcador de progressão da doença (139). Por sua vez, *RASGRP1* (*RAS guanyl releasing protein 1*) foi classificado em um grupo de 27 genes correlacionados positivamente com a sobrevida global de pacientes com LLA BCR-ABL+ (140). Apesar de *ERK1* e *ERK2* não terem sido encontrados como diferencialmente expressos neste estudo, estes genes foram identificados como ponto central de interação na segunda rede gênica. Estudos apontam que ERK1/2 (141) ou exclusivamente ERK2 (142) podem estar envolvidos em mecanismos de resistência ao IM independentes de BCR-ABL.

A maioria das vias canônicas identificadas pelo programa IPA como significativamente alteradas estão relacionadas a mecanismos do sistema imune. De fato, alguns estudos sugerem que o IM possui efeito imunossupressivo, inibindo a atividade proliferativa das células T primárias pela interrupção da progressão do ciclo celular (143) ou suprimindo a ativação dessas células (144). Algumas moléculas que interagem com o receptor de célula T (TCR) como LCK e ERK1/2 são sensíveis ao IM (143). LCK está envolvida no recrutamento e ativação da proteína ZAP durante a transdução de sinais TCR-CD3 (144). No nosso estudo encontramos a expressão aumentada de *LCK* e *ZAP* em células de pacientes não responsivos pós-tratamento com IM. *ZAP* foi mapeado na segunda

rede gênica pelo programa IPA como um dos pontos centrais de interação entre outros genes.

Entre os lncRNAs identificados com expressão aumentada nas amostras pós-NR, destacamos *ncPXN* (AS-TIN), *ncNCAM1* (S-TIN) e *ncRASEF* (S-TIN), cujos genes codificadores de proteína foram descritos em estudos relacionados à atividade oncogênica de *BCR-ABL* ou ao tratamento com IM em LMC. *PXN* codifica uma proteína localizada no citoesqueleto em uma estrutura denominada adesão focal. A interação entre *PXN*,  $p210^{BCR-ABL}$  e *CRKL* foi demonstrada por Salgia et al. (145). Carulli et al. (146) detectaram expressão anormal de *NCAM1* (CD56) em células plasmáticas de pacientes em tratamento com IM, sugerindo que o uso deste composto pode induzir o aparecimento de hipogamaglobulinemias em pacientes com LMC. A expressão aumentada de *RASEF* induziu a ativação das caspases 3 e 9 em células de pacientes com LMC tratadas com inibidores de tirosinoquinase ABL, levando à indução da apoptose e à inibição da proliferação de células progenitoras BCR/ABL positivas (147).

Considerando os resultados encontrados a partir do uso das duas plataformas, identificamos doze *loci* a partir dos quais lncRNAs TIN e seus correspondentes genes codificadores de proteína são transcritos com o mesmo padrão de expressão. Provavelmente nestes casos, a transcrição de lncRNAs TIN pode estar relacionada à modulação da taxa de transcrição ou à estabilização em *cis* dos seus correspondentes transcritos codificadores de proteína (87).

Em resumo, a expressão diferencial de lncRNAs identificada entre amostras de pacientes responsivos e não responsivos ao tratamento com IM ou dasatinibe sugere um envolvimento de RNAs não codificadores no fenômeno multifatorial de resistência. A

validação da expressão diferencial dos transcritos codificadores e não codificadores, realizada a partir de um novo conjunto de amostras, consistirá em uma importante etapa para a associação de tais transcritos ao processo de resistência.



*Conclusões*

---



1. Mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* foram identificadas em 37% (26/71) dos pacientes resistentes ao tratamento com TKIs, sendo as mutações mais frequentes T315I (25%), M244V (18%) e E255K/V (14%).
2. Pacientes com mutações no domínio quinásico *BCR-ABL* apresentaram taxas de SG ( $p = 0,008$ ), SLP ( $p = 0,03$ ) e SLE ( $p = 0,006$ ) menores que pacientes sem mutações. Pacientes com mutação T315I tiveram taxas menores de SG ( $p = 0,04$ ) e SLE ( $p = 0,03$ ) quando comparados aos pacientes com mutações localizadas na *P-loop* e demais regiões. Os pacientes com mutações e que foram tratados com TKIs de segunda geração após resistência ao IM, tiveram taxas maiores de SG ( $p = 0,006$ ), SLP ( $p = 0,007$ ) e SLE ( $p = 0,04$ ) em relação aos pacientes com mutações que não receberam tratamento com dasatinibe e/ou nilotinibe.
3. Conjuntos de genes codificadores de proteína e lncRNAs intrônicos diferencialmente expressos puderam ser identificados a partir da comparação de subgrupos de amostras pré e pós-tratamento de R e NR ao dasatinibe. Entre as amostras pré-R e pré-NR, um número reduzido de transcritos foi identificado com expressão diferencial. Entre as amostras pré-R e pós-NR foram identificados os transcritos *ABCF2*, *ncCD44*, *ncTNFAIP8* e *ncFOXO3A*, enquanto entre as amostras pré-NR e pós-NR, os transcritos *IFNG*, *FASLG*, *AKT1* e *STAT1* foram identificados como diferencialmente expressos.

4. A análise funcional *in silico* mostrou que as redes gênicas mais estatisticamente enriquecidas incluíram genes relacionados à “Sinalização e Interação Celular” para as análises do subgrupo 2 (pré-R e pós-NR) e subgrupo 3 (pré-NR e pós-NR). A função biológica identificada como mais enriquecida com genes dos mesmos *loci* dos lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras pré-R e pós-NR foi “Morte Celular”. Esta mesma categoria foi uma das mais enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre as amostras pré-NR e pós-NR.
  
5. No estudo com imatinibe, os perfis de expressão de genes codificadores e lncRNAs gerados a partir das amostras pré-R e pré-NR e das amostras pré-R e pós-NR não distinguiram totalmente os pacientes de acordo com a classificação de resposta utilizada neste estudo. Entre os transcritos diferencialmente expressos entre as amostras pré-R e pós-NR foram encontrados *LEF1*, *IL7R*, *BCL2*, *FYN*, *ncPXN*, *ncNCAM1* e *ncRASEF*.
  
6. A análise funcional *in silico* realizada a partir dos transcritos diferencialmente expressos entre as amostras pré-R e pós-NR do estudo com IM mostrou que um grande número de funções biológicas e redes gênicas foram identificadas como significativamente enriquecidas. Os genes *LEF1*, *IL7R*, *BCL2* e *FYN* associados a funções biológicas como “Desenvolvimento e Função do Sistema Hematopoiético” e “Hematopoiese”, foram descritos anteriormente em estudos relacionados à progressão da LMC e à resistência ao IM. Porém, nossos resultados devem ser

interpretados com cautela, uma vez que este conjunto de transcritos não conseguiu distinguir totalmente os casos R e NR.

7. Nosso estudo sugere entre os genes codificadores e lncRNAs diferencialmente expressos em amostras de pacientes R e NR alguns transcritos que podem potencialmente estar envolvidos em mecanismos de resistência ao tratamento com IM ou dasatinibe em LMC. Estudos futuros serão necessários para determinar a relevância destes transcritos no processo de resistência clínica.



## *Referências*

---



1. Deininger MW. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(2):59-72.
2. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103(11):4010-22.
3. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):441-53.
4. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
5. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-293.
6. Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell*. 2002;1(1):31-6.
7. Druker B. Targeted therapy for chronic myeloid leukemia. In: Kaushansky K, Berliner N, editors. *50 Years in Hematology: research that revolutionized patient care*. 2008:13-15.
8. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-30.
9. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-82.
10. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-30.
11. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105(7):2640-53.
12. Corbin AS, Buchdunger E, Pascal F, Druker BJ. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J Biol Chem*. 2002;277(35):32214-9.
13. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276-83.
14. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8(11):1018-29.
15. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108(6):1809-20.
16. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(11):994-1004.

17. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(6):1054-61.
18. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041-51.
19. Shah NP. Loss of response to imatinib: mechanisms and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:183-7.
20. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009;16(2):122-31.
21. Ernst T, Hochhaus A. Chronic myeloid leukemia: clinical impact of BCR-ABL1 mutations and other lesions associated with disease progression. *Semin Oncol*. 2012;39(1):58-66.
22. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-80.
23. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002;99(9):3472-5.
24. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2(2):117-25.
25. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003;101(2):690-8.
26. Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34227-39.
27. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007;110(12):4064-72.
28. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011;118(5):1208-15.
29. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2531-41.

30. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4100-9.
31. Jabbour E, Branford S, Saglio G, Jones D, Cortes JE, Kantarjian HM. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011;117(9):1800-11.
32. Nicolini FE, Corm S, Le QH, Sorel N, Hayette S, Bories D, et al. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP). *Leukemia*. 2006;20(6):1061-6.
33. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(7):2242-9.
34. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistrini V, Perini P, Marega M, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol*. 2009;27(3):469-71.
35. Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood*. 2009;114(27):5426-35.
36. Khorashad JS, Anand M, Marin D, Saunders S, Al-Jabary T, Iqbal A, et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia*. 2006;20(4):658-63.
37. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004;47(27):6658-61.
38. Quintas-Cardama A, Cortes J. Kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2006;4(5):365-74.
39. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305(5682):399-401.
40. Cortes J, Rousselot P, Kim DW, Ritchie E, Hamerschlak N, Coutre S, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*. 2007;109(8):3207-13.
41. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*. 2008;22(6):1200-6.

42. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.*;362(24):2260-70.
43. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood.* 2012;119(5):1123-9.
44. Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood.* 2009;114(24):4944-53.
45. Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, et al. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2562-9.
46. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Castagnetti F, Rosti G, Bosi C, et al. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica.* 2007;92(3):401-4.
47. Khorashad JS, Milojkovic D, Mehta P, Anand M, Ghorashian S, Reid AG, et al. In vivo kinetics of kinase domain mutations in CML patients treated with dasatinib after failing imatinib. *Blood.* 2008;111(4):2378-81.
48. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;362(24):2251-9.
49. Hughes T, Saglio G, Branford S, Soverini S, Kim DW, Muller MC, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol.* 2009;27(25):4204-10.
50. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell.* 2009;16(5):401-12.
51. O'Hare T, Deininger MW, Eide CA, Clackson T, Druker BJ. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clin Cancer Res.* 2011;17(2):212-21.
52. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2012;367(22):2075-88.
53. Kim D, Cortes JE, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. Efficacy and safety of ponatinib according to prior approved tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CP-CML): results from the PACE trial. In: *Chronic Myeloid Leukemia - Therapy.* In: ASH Annual Meeting Abstracts; 2012. Washington: Blood. 2012;120:3749.
54. Kantarjian HM, Kim D, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. Efficacy and safety of ponatinib in patients with accelerated phase or blast phase chronic myeloid leukemia (AP-CML or BP-CML) or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+

ALL): 12-month follow-up of the PACE trial. In: Chronic Myeloid Leukemia - Therapy II. In: ASH Annual Meeting Abstracts; 2012. Washington: Blood. 2012;120:915.

55. Ohmine K, Ota J, Ueda M, Ueno S, Yoshida K, Yamashita Y, et al. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2001;20(57):8249-57.

56. Staal FJ, Cario G, Cazzaniga G, Haferlach T, Heuser M, Hofmann WK, et al. Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia*. 2006;20(8):1385-92.

57. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286(5439):531-7.

58. Song JH, Kim HJ, Lee CH, Kim SJ, Hwang SY, Kim TS. Identification of gene expression signatures for molecular classification in human leukemia cells. *Int J Oncol*. 2006;29(1):57-64.

59. Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene*. 2003;22(25):3952-63.

60. Kaneta Y, Kagami Y, Katagiri T, Tsunoda T, Jin-nai I, Taguchi H, et al. Prediction of sensitivity to STI571 among chronic myeloid leukemia patients by genome-wide cDNA microarray analysis. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93(8):849-56.

61. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2794-9.

62. Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, et al. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2006;20(8):1400-7.

63. Villuendas R, Steegmann JL, Pollan M, Tracey L, Granda A, Fernandez-Ruiz E, et al. Identification of genes involved in imatinib resistance in CML: a gene-expression profiling approach. *Leukemia*. 2006;20(6):1047-54.

64. Rinn JL, Euskirchen G, Bertone P, Martone R, Luscombe NM, Hartman S, et al. The transcriptional activity of human Chromosome 22. *Genes Dev*. 2003;17(4):529-40.

65. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799-816.

66. Bertone P, Stolc V, Royce TE, Rozowsky JS, Urban AE, Zhu X, et al. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*. 2004;306(5705):2242-6.

67. Johnson JM, Edwards S, Shoemaker D, Schadt EE. Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments. *Trends Genet*. 2005;21(2):93-102.

68. Mattick JS. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet*. 2004;5(4):316-23.

69. Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics*. 2009;93(4):291-8.
70. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1-12.
71. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
72. Yendamuri S, Calin GA. The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia*. 2009;23(7):1257-63.
73. Bueno MJ, Perez de Castro I, Gomez de Cedron M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell*. 2008;13(6):496-506.
74. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
75. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):94-108.
76. Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*. 2009;136(4):656-68.
77. Yazgan O, Krebs JE. Noncoding but nonexpendable: transcriptional regulation by large noncoding RNA in eukaryotes. *Biochem Cell Biol*. 2007;85(4):484-96.
78. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*. 2011;1(5):391-407.
79. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. 2011;10:38.
80. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-23.
81. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010;464(7291):1071-6.
82. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*. 2008;451(7175):202-6.
83. Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, et al. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*. 2004;14(3):331-42.
84. Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, Almeida GT, et al. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*. 2004;23(39):6684-92.

85. Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MR, Nagai MA, da Silva W, Jr., et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3491-6.
86. Reis EM, Louro R, Nakaya HI, Verjovski-Almeida S. As antisense RNA gets intronic. *Omic*. 2005;9(1):2-12.
87. Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, et al. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol*. 2007;8(3):R43.
88. Tahira AC, Kubrusly MS, Faria MF, Dazzani B, Fonseca RS, Maracaja-Coutinho V, et al. Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2011;10:141.
89. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein He. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: World Health Organization (WHO)/IARC; 2008.
90. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8(3):175-85.
91. Lee WH, Vega VB. Heterogeneity detector: finding heterogeneous positions in Phred/Phrap assemblies. *Bioinformatics*. 2004;20(16):2863-4.
92. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Rea D, Dorlhiac-Llacer PE, Milone JH, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3204-12.
93. Kantarjian H, Cortes J, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, Pasquini R, DiPersio J, et al. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood*. 2009;113(25):6322-9.
94. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.
95. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5116-21.
96. Molinaro AM, Simon R, Pfeiffer RM. Prediction error estimation: a comparison of resampling methods. *Bioinformatics*. 2005;21(15):3301-7.
97. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Palandri F, Abruzzese E, et al. Abl kinase domain mutations are infrequent in early-chronic phase chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. In: *Chronic myeloid leukemia - Biology*. In: 13<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association - Abstract Book; 2008. Pavia: Haematologica. 2008;93(suppl 1):107.

98. Alvarado Y, Kantarjian H, O'Brien S, Faderl S, Borthakur G, Burger J, et al. Significance of suboptimal response to imatinib, as defined by the European LeukemiaNet, in the long-term outcome of patients with early chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Cancer*. 2009;115(16):3709-18.
99. Branford S, Goh H-G, Izzo B, Beppu L, Ortmann C-E, Duniec K, et al. A review of mutation analysis in the TOPS trial of standard versus high dose IM in CML suggests that refinements to the ELN recommendations for mutation screening may be appropriate. In: *Chronic Myeloid Leukemia - Therapy: Management of Imatinib-Resistant CML*. In: ASH Annual Meeting Abstracts; 2010. Washington: Blood. 2010;116:889.
100. Azam M, Seeliger MA, Gray NS, Kuriyan J, Daley GQ. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(10):1109-18.
101. Mian AA, Schull M, Zhao Z, Oancea C, Hundertmark A, Beisert T, et al. The gatekeeper mutation T315I confers resistance against small molecules by increasing or restoring the ABL-kinase activity accompanied by aberrant transphosphorylation of endogenous BCR, even in loss-of-function mutants of BCR/ABL. *Leukemia*. 2009;23(9):1614-21.
102. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Breeden M, Garcia-Manero G, O'Brien S, et al. Characteristics and outcomes of patients with chronic myeloid leukemia and T315I mutation following failure of imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2008;112(1):53-5.
103. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2006;20(10):1767-73.
104. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2009;114(10):2168-71.
105. Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, et al. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood*. 2005;106(6):2128-37.
106. Parker WT, Lawrence RM, Ho M, Irwin DL, Scott HS, Hughes TP, et al. Sensitive detection of BCR-ABL1 mutations in patients with chronic myeloid leukemia after imatinib resistance is predictive of outcome during subsequent therapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4250-9.
107. Jabbour E, Kantarjian HM, Jones D, Reddy N, O'Brien S, Garcia-Manero G, et al. Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with F317L BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2008;112(13):4839-42.
108. Fritzsche FR, Stephan C, Gerhardt J, Lein M, Hofmann I, Jung K, et al. Diagnostic and prognostic value of T-cell receptor gamma alternative reading frame protein (TARP) expression in prostate cancer. *Histol Histopathol*. 2010;25(6):733-9.
109. Tang S, Bhatia B, Maldonado CJ, Yang P, Newman RA, Liu J, et al. Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(18):16189-201.

110. Landais S, Landry S, Legault P, Rassart E. Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia. *Cancer Res.* 2007;67(12):5699-707.
111. Ranganathan P, Rangnekar VM. Regulation of cancer cell survival by Par-4. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1059:76-85.
112. Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Chow KU, Bergmann M, Ruthardt M, Hoelzer D, et al. Prostate apoptosis response gene-4 (par-4) abrogates the survival function of p185(BCR-ABL) in hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2004;32(7):649-56.
113. L'Esperance S, Popa I, Bachvarova M, Plante M, Patten N, Wu L, et al. Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol.* 2006;29(1):5-24.
114. Tsuda H, Ito YM, Ohashi Y, Wong KK, Hashiguchi Y, Welch WR, et al. Identification of overexpression and amplification of ABCF2 in clear cell ovarian adenocarcinomas by cDNA microarray analyses. *Clin Cancer Res.* 2005;11(19 Pt 1):6880-8.
115. McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, Vartanian K, Willis SG, Yochum G, et al. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood.* 2010;115(2):315-25.
116. McLean LA, Gathmann I, Capdeville R, Polymeropoulos MH, Dressman M. Pharmacogenomic analysis of cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Clin Cancer Res.* 2004;10(1 Pt 1):155-65.
117. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G, et al. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer.* 2009;115(11):2482-90.
118. Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol.* 2012;29(11):1039-45.
119. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell.* 2009;136(4):629-41.
120. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96(10):3343-56.
121. Grosso S, Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquel A, Lebrigand K, et al. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(7):1924-33.
122. Eisele L, Klein-Hitpass L, Chatzimanolis N, Opalka B, Boes T, Seeber S, et al. Differential expression of drug-resistance-related genes between sensitive and resistant blasts in acute myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2007;117(1):8-15.
123. Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, Mori M, Kirito K, Kikuchi S, et al. A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6411-9.

124. Essafi A, Fernandez de Mattos S, Hassen YA, Soeiro I, Mufti GJ, Thomas NS, et al. Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene*. 2005;24(14):2317-29.
125. Kim DH, Kong JH, Byeun JY, Jung CW, Xu W, Liu X, et al. The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2010;16(21):5339-50.
126. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*. 1995;86(2):726-36.
127. Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. Characteristics of dasatinib- and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6181-6.
128. Nunoda K, Tauchi T, Takaku T, Okabe S, Akahane D, Sashida G, et al. Identification and functional signature of genes regulated by structurally different ABL kinase inhibitors. *Oncogene*. 2007;26(28):4179-88.
129. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 2004;351(7):657-67.
130. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK, Ghosh R, Roy R, et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia*. 2007;21(5):949-55.
131. Sanchez-Garcia I, Grutz G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5287-91.
132. Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanty AG. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene*. 1998;16(3):335-48.
133. Ban K, Gao Y, Amin HM, Howard A, Miller C, Lin Q, et al. BCR-ABL1 mediates up-regulation of Fyn in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2904-8.
134. Hamdane M, David-Cordonnier MH, D'Halluin JC. Activation of p65 NF-kappaB protein by p210BCR-ABL in a myeloid cell line (P210BCR-ABL activates p65 NF-kappaB). *Oncogene*. 1997;15(19):2267-75.
135. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev*. 1998;12(7):968-81.
136. Greiner A, Muller KB, Hess J, Pfeffer K, Muller-Hermelink HK, Wirth T. Up-regulation of BOB.1/OBF.1 expression in normal germinal center B cells and germinal center-derived lymphomas. *Am J Pathol*. 2000;156(2):501-7.
137. Zhao C, Ma H, Bossy-Wetzel E, Lipton SA, Zhang Z, Feng GS. GC-GAP, a Rho family GTPase-activating protein that interacts with signaling adapters Gab1 and Gab2. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34641-53.

138. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*. 2002;1(5):479-92.
139. Zheng C, Li L, Haak M, Brors B, Frank O, Giehl M, et al. Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia*. 2006;20(6):1028-34.
140. Juric D, Lacayo NJ, Ramsey MC, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, et al. Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Oncol*. 2007;25(11):1341-9.
141. Nambu T, Araki N, Nakagawa A, Kuniyasu A, Kawaguchi T, Hamada A, et al. Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci*. 2010;101(1):137-42.
142. Aceves-Luquero CI, Agarwal A, Callejas-Valera JL, Arias-Gonzalez L, Esparis-Ogando A, del Peso Ovalle L, et al. ERK2, but not ERK1, mediates acquired and "de novo" resistance to imatinib mesylate: implication for CML therapy. *PLoS One*. 2009;4(7):e6124.
143. Dietz AB, Souan L, Knutson GJ, Bulur PA, Litzow MR, Vuk-Pavlovic S. Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood*. 2004;104(4):1094-9.
144. Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, et al. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood*. 2005;105(6):2473-9.
145. Salgia R, Li JL, Lo SH, Brunkhorst B, Kansas GS, Sobhany ES, et al. Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem*. 1995;270(10):5039-47.
146. Carulli G, Cannizzo E, Ottaviano V, Cervetti G, Buda G, Galimberti S, et al. Abnormal phenotype of bone marrow plasma cells in patients with chronic myeloid leukemia undergoing therapy with Imatinib. *Leuk Res*. 2010;34(10):1336-9.
147. Nakamura S, Takemura T, Tan L, Nagata Y, Yokota D, Hirano I, et al. Small GTPase RAB45-mediated p38 activation in apoptosis of chronic myeloid leukemia progenitor cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(12):1758-72.



*Anexos*

---



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 18/11/03.

(Grupo III)

**PARECER PROJETO: N° 408/2003**

**I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES DE PONTO DO GENE BCR/ABL EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA RESISTENTES AO MESILATO DE IMATINIB (GLIVEC)”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Kátia Borgia Barbosa Pagnano**

**INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP**

**APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/09/2003**

**APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/11/04**

**II - OBJETIVOS**

Os objetivos são: avaliar a presença de mutações de ponto na região de ligação do ATP do gene BCR/ABL em pacientes com resistência primária ou secundária à droga de mesilato de Imatinib (Glivec); correlacionar o tipo de mutação encontrado com dados clínicos (fase da doença, resposta ao tratamento com o Imatinib) e prognóstico dos pacientes (tempo de sobrevida global, livre de progressão da doença).

**III - SUMÁRIO**

Será utilizada amostra de sangue periférico e/ou medula óssea de pacientes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) acompanhados no Hemocentro da UNICAMP. Será coletado 5 ml de sangue de pacientes em pré tratamento com Glivec e após adquirir resistência à droga ou apresentar perda da resposta hematológica ou citogenética. As amostras serão coletadas juntamente com a amostra colhida rotineiramente para controle da atividade da doença de avaliação de resposta citogenética (feito a cada 3 meses) será extraído RNA do sangue periférico ou medula óssea. Após a centrifugação da amostra e descarte do plasma, será realizado lise das hemácias, para obter os leucócitos e isolado o RNA, ampliação por RT-PCR da região de interesse do BCR/ABL seguida de sequenciamento direto a fim de verificar a ocorrência de mutações no gene que possam ser responsáveis pela resistência ao Imatinib

**IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Termo de consentimento adequado e completo. Orçamento de 40.000,00 reais para material de consumo a ser solicitado à FAPESP. Projeto completo e bem estruturado e corrigido, agora contemplando todos os itens necessários para aprovação ética.

## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de novembro de 2003.

  
**Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP.

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-7187

🌐 [www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fem.unicamp.br](mailto:cep@fem.unicamp.br)

CEP, 22/11/05.  
(Grupo III)

**PARECER PROJETO:** Nº 696/2005

**CAAE:** 1634.1.146.270-05

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA PRÉ E APÓS O TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE OU DASATINIB (BMS-354825)”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Rosana Antunes da Silveira

**INSTITUIÇÃO:** HEMOCENTRO - UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/11/2005

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 22/11/06

### II - OBJETIVOS

Identificar perfis de expressão gênica apresentados por pacientes na fase pré-tratamento com Mesilato de imatinibe que possam estar associados aos diferentes tipos de resposta apresentados após um ano de tratamento. Identificar perfis de expressão gênica apresentados por pacientes na fase pré-tratamento com dasatinib (BMS-354825) que possam estar associados aos diferentes tipos de resposta apresentados. Caracterizar os perfis de expressão gênica apresentados por pacientes durante o tratamento com Mesilato de imatinibe ou dasatinib (BMS-354825) e que apresentem má resposta ao tratamento, para tentar identificar algum perfil de expressão comum aos pacientes com má evolução.

### III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo realizado para entender os mecanismos da Leucemia Mielóide Crônicas, buscando identificar perfis de expressão gênica apresentados por pacientes na fase de pré-tratamento com Mesilato de imatinibe ou dasatinib que possam estar associados a diferentes tipos de respostas e perfis de expressão gênica comuns pacientes que tiveram má evolução após um ano de acompanhamento. Os pacientes que serão avaliados são os portadores de LMC e que estão em acompanhamento no Hemocentro da UNICAMP. Serão coletados 10-20ml de sangue periférico e/o 5ml de medula óssea. As amostras serão de pacientes com LMC em fase de pré-tratamento com Mesilato de imatinibe ou dasatinib (BMS-354825) e após o início do tratamento (12 meses ou quando houver resistência aos fármacos). Todos os pacientes serão maiores de 18 anos. Os pacientes tratados com Mesilato de imatinibe ou dasatinib farão acompanhamento clínico, com avaliação semanal e quinzenal de hemograma nos primeiros 3 meses e mensal após esse período. Ainda serão realizadas análise citogenética a cada 6 meses e análise molecular dos transcritos BCR-ABL pela técnica de PCR em tempo real e/ou nested PCR a cada 3 meses. A

resistência aos inibidores será definida como a falha em atingir: resposta hematológica em e meses, resposta citogenética completa após 12 meses de tratamento, resposta molecular (queda de 3 logs no número de transcritos BCR-ABL), ou perda das respostas acima. O planejamento e de inclusão de pelo menos 20-30 casos novos de LMC por ano no tratamento com Mesilato de imatinibe. Dos pacientes atualmente em tratamento com imatinibe em fase crônica tardia e fases avançadas, estima-se que cerca de 10-20 casos terão alguma forma de resistência e serão tratados com dasatinib. Além disso, pacientes de outros centros poderão ser avaliados, com ampliação da casuística. Ainda, serão analisados separadamente pacientes que iniciaram a medicação em fase crônica ou fase avançada da doença (FC/FA).

#### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

A pesquisa não resultará em quaisquer riscos ou prejuízos para os sujeitos envolvidos, em todas as suas fases, uma vez que serão utilizadas somente amostras de sangue periférico ou de medula óssea coletadas pré-tratamento com imatinibe ou dasatinib e durante o acompanhamento do tratamento. Os materiais biológicos em questão serão empregados somente para a finalidade descrita nesse protocolo e no consentimento livre e esclarecido. O projeto apresenta boa bibliografia. Apresenta Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), simples e de boa compreensão. Não haverá compensação financeira ou custos decorrentes da participação do sujeito no estudo. Apresenta Orçamento da Pesquisa no valor de R\$ 15.000,00 para material de consumo, tendo sido solicitado auxílio à FAPESP, em andamento.

#### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2005.

  
**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



## *Apêndices*

---



## APÊNDICE 1

---

### Artigo aceito para publicação no periódico Hematology

Link para versão on-line:

<http://www.ingentaconnect.com/content/maney/hem/pre-prints/1607845413Y.0000000094>

#### **Protein-coding genes and long noncoding RNAs are differentially expressed in dasatinib-treated chronic myeloid leukemia patients with resistance to imatinib**

Rosana A. Silveira<sup>1,§</sup>, Angela A. Fachel<sup>2,§</sup>, Yuri B. Moreira<sup>2</sup>, Carmino A. De Souza<sup>1</sup>,  
Fernando F. Costa<sup>1</sup>, Sergio Verjovski-Almeida<sup>2</sup>, Katia B. B. Pagnano<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas - UNICAMP, 13083-878  
Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-900, São  
Paulo, SP, Brazil

<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author:

Katia B B Pagnano, Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, Rua Carlos Chagas,  
480, Cidade Universitária “Prof. Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, CEP 13083-878,  
Campinas/SP, Brazil. Tel.: +55 01935218759

E-mail address: [kborgia@unicamp.br](mailto:kborgia@unicamp.br)

## **Abstract**

Dasatinib has demonstrated efficacy in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML) who had resistance or intolerance to imatinib. However, some patients also develop resistance or intolerance to dasatinib. To identify potential molecular pathways involved in primary resistance to dasatinib in CML, we analyzed gene expression profiles of mononuclear cells of 7 imatinib-resistant patients, collected before and after one-year dasatinib treatment. Large-scale gene expression was measured with Agilent microarrays covering protein-coding genes and long (> 200 nt) noncoding RNAs (lncRNAs). Sets of genes and lncRNAs significantly differentially expressed (> 1.5 fold-change; q-value  $\leq$  10%) were identified. Ingenuity Pathway Analysis pointed to a number of functions, canonical pathways and gene networks that were significantly enriched with differentially expressed genes. In addition to protein-coding genes, lncRNAs have been recently implicated in pathways leading to tumorigenesis. Our data point to new possible regulatory elements involved in dasatinib resistance in CML.

## Introduction

Although most patients with chronic myeloid leukemia (CML) have high rates of hematologic and cytogenetic responses to imatinib (Glivec<sup>®</sup>), some are intrinsically resistant or may develop resistance. Mechanisms of imatinib resistance include point mutations within the BCR-ABL kinase domain [1-3], BCR-ABL gene amplification [1], decreased intracellular drug availability [4], and activation of alternative signaling oncogenic pathways [5, 6].

Dasatinib is a second-generation tyrosine kinase inhibitor, with activity against BCR-ABL, Src family kinases, PDGF- $\beta$ , EphA2, and c-Kit receptor kinases [7]. Its clinical efficacy has been demonstrated in phase II and III trials [8, 9]. Nevertheless, clinical resistance to dasatinib has been associated with preexisting or emerging mutations mainly in amino acids T315, F317, and V299 in the BCR-ABL kinase domain [10, 11]. In the cases without known mutations, heterogeneous secondary genomic alterations may be a possible mechanism of resistance [12].

In an attempt to predict the efficacy of imatinib treatment in CML patients, predictive models have been built associating microarray expression profiles with cytogenetic response [13-17]. Regarding prediction of dasatinib response, molecular marker candidates have been reported for breast, lung, ovarian and prostate cancer [18, 19], but not for leukemia.

Noncoding RNAs (ncRNAs) are involved in important biological processes, including those leading to human tumorigenesis [20, 21] and hematological malignancies [22, 23]. It was shown that long (> 200 nt) antisense ncRNAs, a class of ncRNAs transcribed from the opposite strand of protein-coding genes, correlate significantly with the degree of prostate tumor differentiation [24]. Long ncRNAs correlated to cancer were also identified in renal cell carcinoma [25], laryngeal squamous cell carcinoma [26], breast and ovarian cancers [20, 25, 26] and in pancreatic cancer [27].

In this study, we identified long ncRNAs and protein-coding genes that were differentially expressed in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples of cytogenetic responders and non-responders to dasatinib. Our findings suggest potential molecular mechanisms that may be involved in primary cytogenetic resistance to dasatinib in CML patients previously resistant to imatinib.

## **Patients and methods**

### *Patient recruitment*

A total of eighteen chronic myeloid leukemia patients previously resistant to imatinib treatment have signed an informed consent to be enrolled in this study. All imatinib-resistant patients were treated with dasatinib 100-140 mg/day and participated in CA180034 and CA180035 trials [28, 29]. Pre- and post-treatment paired samples from seven of these patients yielded extracted total RNA of good quality for microarray assays (see below) and were kept in this study.

After dasatinib start, patients were followed with blood cell counts every 2 weeks for 6 weeks, then every 3 months. Bone marrow aspirates for cytology and cytogenetics were performed after one, 3, 6 months and then every 6 months, according to protocol. Patients were classified as dasatinib responders (R) if they achieved a major (complete or partial) cytogenetic response (MCgR: Ph+ 0%-35%) within twelve months, and those who failed to achieve response within 12 months or progressed to advanced disease were classified as non-responders (NR). Mutational analysis in the BCR-ABL kinase domain was performed by direct sequencing, as described in Branford et al, 2002 [2]. An additional pair of primers was used for sequencing reactions: 5'-ACGCCGTGGTGCTGCTGT-3' (forward) and 5'-TCTCCCCTACCAGGCAGTTT-3' (reverse).

### *Total RNA isolation*

Peripheral blood samples were collected prior to and after 1 year of treatment or at time of relapse. Mononuclear cells were separated from peripheral blood samples using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) by density-gradient centrifugation. Total RNA was extracted using TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), treated with RNase-free DNase I (Qiagen, Hilden, Germany), and purified using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA purity was measured by absorbance in the NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and integrity of each RNA sample was examined by electrophoresis in the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### *Microarray Experiments*

Hybridizations were performed with two distinct array platforms. The first was the Whole Human Genome G4112F 44K Microarray (Agilent Technologies) containing nearly 40,000 probes that map to 19,417 unique protein-coding Entrez GeneIDs annotated and deposited by Agilent in the GEO platform under accession number GPL4133. The second, a custom-designed 44K oligoarray [30] printed by Agilent Technologies, containing 24,448 probes to long (> 200 nt) ncRNAs (lncRNAs) mapping to intronic regions within 6,282 unique protein-coding gene loci (hg17 with genomic coordinates of the UCSC Human Genome). Probes are sense and antisense and represent totally (TIN) and partially (PIN) intronic lncRNAs with respect to the protein-coding gene in the locus, or represent lncRNAs mapping to 1,124 intergenic regions [30]. Gene locus name annotation for intronic lncRNA is that of the protein-coding gene of the same locus; intergenic lncRNA is annotated with the name of the nearest protein-coding gene in that

chromosome. The custom array design is deposited in the GEO platform under accession number GPL9193.

Sample preparation and microarray procedures were performed following Agilent Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol (Version 5.5) specifications. Starting with 200 ng of total RNA, we performed cDNA synthesis and generated fluorescently labeled cRNA targets using Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit and oligo-dT-T7 promoter primer, according to manufacturer's instructions. Each patient sample was separately labeled with Cy3 and Cy5 to perform a dye swap technical replicate. Labeled cRNA was hybridized using Agilent Gene Expression Hybridization Kit. Slides were washed, dried and scanned on a GenePix 4000B Scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### *Data Analysis*

Gene probes for which the signal was significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the local background intensity, as identified by Agilent Feature Extraction Software 9.5.1.1, were considered in the analysis only when they were detected in 75% of the arrays (21/28) in the Whole Human Genome G4112F Microarrays or in 80% of the arrays (21/26) in the custom oligoarrays. This resulted in 27,824 probes representing protein-coding genes and 5,496 probes representing lncRNAs that were expressed in the patient samples. Normalization was carried out using quantile method [31]. Raw and processed microarray data have been deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE33290 for protein-coding gene and lncRNA analyses.

Expression data from cytogenetic responder (R) and non-responder (NR) patient samples were compared in three different combinations (subgroups) for identification of significantly differentially expressed genes. Subgroup 1: pre-treatment samples from R *versus* pre-treatment

samples from NR. Subgroup 2: pre-treatment samples from R *versus* post-treatment samples from NR. Subgroup 3: pre-treatment *versus* post-treatment samples from NR.

Significance Analysis of Microarrays (SAM) two-class unpaired test [32] was performed to identify significantly differentially expressed transcripts in each subgroup. To strengthen the robustness of the identified signature, we performed a patient leave-one-out cross-validation analysis [33], i.e. SAM analyses were repeated seven times, each with 6 patient samples. Each of these statistical analyses resulted in one list of significantly differentially expressed probes (for protein-coding genes a minimal 2-fold change and q-value  $\leq 5\%$  were used; for lncRNAs, a minimal 1.5-fold change and q-value  $\leq 10\%$  were used). Only those transcripts that appeared in 100% of the lists identified by SAM and patient leave-one-out approach were included in the final profile.

Z-score normalization and supervised hierarchical clustering were performed using Spotfire Decision Site 9.1.2 (TIBCO, Somerville, MA, USA). Functional annotation of differentially expressed transcripts was performed using Gene Ontology (GO) terms at eGOn V2.0 software ([www.genetools.microarray.ntu.no/egon](http://www.genetools.microarray.ntu.no/egon)) [34]. For lncRNAs we have assigned the function of the protein-coding genes from the corresponding genomic loci, assuming that lncRNAs might act in cis (see also Discussion). Overrepresentation analysis of GO terms was performed using hypergeometric distribution with the Benjamini-Hochberg correction for multiple testing ( $p \leq 0.05$ ) [34].

Differentially expressed transcripts were subjected to Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software, version 9.0 (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, USA) for mapping biological function and identifying gene networks and canonical pathways that were significantly enriched with affected genes upon dasatinib treatment.

## Results

### *Patients' characteristics and mutational status*

RNA samples from peripheral blood mononuclear cells were available from 7 patients. Of these, 3 were classified as R (complete cytogenetic response: n = 2; partial cytogenetic response: n = 1) and 4 as NR ( $\geq 90\%$  Ph<sup>+</sup> metaphases; Table 1). After treatment, one patient with complete cytogenetic response presented a transient chromosomal abnormality in 20% of Ph negative cells (trisomy 8).

Responsive patients had no mutations detected in pre- and post-dasatinib. Two out of four non-responder patients had G250E (n = 1) and F317L (n = 1) mutations in the BCR-ABL kinase domain detected before treatment. Mutational status after treatment was tested only for the patient with F317L mutation and it was confirmed.

Our aim was to study CML patients treated with dasatinib in order to identify genes that may be involved in primary cytogenetic resistance to the treatment. For this, we compared the gene expression profiles of pre- and post-treatment PBMC samples from dasatinib treated patients. Because the PBMC population in post-treatment CML dasatinib responders (post-R) is expected to be predominantly comprised of normal cells, only three types of samples were used for comparisons, namely pre-R, pre-NR and post-NR; thus, post-R samples were excluded from the analyses.

### *Gene expression profile of pre-treatment subgroup*

PBMC samples from R and NR patients were taken before dasatinib treatment (pre-R and pre-NR) and their large-scale gene expression profiles were compared (subgroup 1). Five protein-coding genes were significantly differentially expressed; among them, 3 were overexpressed

(*ALOX15B*, *ACSS2*, and *C20orf201*) and 2 underexpressed (*TARP* and *TMEM64*) in NR (Figure 1A; Table 2). Additionally, 2 sense lncRNAs (*ncMYLIP* and *ncSLC44A2*), both significantly underexpressed in NR were identified (Figure 1B; Table 3). Both loci, *MYLIP* and *SLC44A2*, encode at least two isoforms of each of the protein-coding genes and the lncRNAs are transcribed from the intron adjacent to an alternatively spliced exon.

#### *Gene expression profile of pre-R versus post-NR treatment subgroup*

To further investigate the putative molecular components of dasatinib resistance, pre-dasatinib samples from R patients (pre-R) were compared with post-dasatinib samples from NR (post-NR) (subgroup 2). We identified a 329-probe set representing 285 unique protein-coding genes that were differentially expressed between these groups. Of these, 58 and 227, respectively, were found to be overexpressed or underexpressed in NR patients (Figure 2A). The 50 overexpressed protein-coding genes showing the highest fold changes are listed in Table 4 (see Supplementary Table S1 for complete list).

Overrepresentation analysis of the differentially expressed genes using GO database identified 3 biological process terms with statistically significant enrichment ( $p \leq 0.05$ ): RNA metabolic process, gene expression, and biopolymer metabolic process (Supplementary Table S2).

We submitted our lists of differentially expressed protein-coding genes to the Ingenuity database for mapping biological functions and identifying enriched gene networks and canonical pathways. Many functions were identified as significant by Ingenuity global function analysis ( $p < 0.05$ ), being the most significant “Cell-to-Cell Signaling and Interaction” (Supplementary Table S3). Also, 11 gene networks were identified as significantly enriched (Supplementary Table S4). The most significant network included genes related to “Hematological System Development and Function”, “Tissue Morphology”, and “Cell-to-Cell Signaling and Interaction” (Supplementary

Figure 1A). Significantly enriched canonical pathways were not found for this set of differentially expressed genes.

Using a custom-designed lncRNA array, we identified 97 lncRNAs as differentially expressed in post-treatment samples from NR patients when compared to pre-treatment samples from R patients. These differentially expressed lncRNAs map to intronic regions of protein-coding genes, 61 of which were overexpressed and 36 underexpressed in NR patients (Figure 2B; Supplementary Table S5). Considering the protein-coding genes from the same genomic loci as those of the differentially expressed lncRNAs, three functions were found significantly enriched ( $p < 0.05$ ): “Cell Death”, “Hematological System Development and Function”, and “Tissue Development” (Supplementary Table S6). In addition, six gene networks significantly enriched were identified (Supplementary Table S7; Supplementary Figure 1C). Significantly enriched canonical pathways were not found for this set of transcripts.

#### *Differentially expressed transcripts between pre- and post- treatment samples of NR patients*

Identification of genes differentially expressed between pre- and post-treatment samples from NR patients (subgroup 3) was performed in an attempt to reveal possible mechanisms of resistance exclusive for this set of patients. The majority of protein-coding genes (198 out of 268 differentially expressed genes) (Figure 3A; Supplementary Table S8) and of lncRNAs (60 out of 83 differentially expressed messages) (Figure 3B; Supplementary Table S9) was underexpressed in PBMC samples following treatment, indicating a possible suppression by dasatinib of many biological processes.

Overrepresentation analysis of differentially expressed protein-coding genes pre- and post-treatment in NR patients did not show any enriched GO category. When subsets of under- or overexpressed genes in NR were analyzed separately, a statistically significant enrichment of genes

involved in positive regulation of programmed cell death, regulation of programmed cell death, apoptotic program, nitric oxide biosynthetic process GO categories were identified for the overexpressed genes (Supplementary Table S10).

IPA performed with the list of protein-coding genes differentially expressed between pre- and post-treatment samples in NR patients identified many significantly enriched biological functions. The three most significant were “Infection Mechanism”, “Infectious Disease”, and “Cell Death” (Supplementary Table S11). Four canonical pathways were identified as significantly enriched ( $-\log p > 1.3$ ; i.e.  $p < 0.05$ ): “Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response”, “Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling”, “IL-22 Signaling”, and “Type I Diabetes Mellitus Signaling” (Supplementary Table S12; Supplementary Figure 2). Additionally, eight gene networks were identified as significantly enriched with altered genes (Supplementary Table S13). The most significant network included genes related to “Cell-To-Cell Signaling and Interaction”, “Cellular Function and Maintenance”, and “Inflammatory Response” (Supplementary Figure 1B).

Considering the protein-coding genes from the same genomic loci as those of the differentially expressed lncRNAs, we identified four significantly enriched gene networks. These networks included genes involved in “Cellular Assembly and Organization”, “Cellular Function and Maintenance”, “Genetic Disorder”, “Cancer”, and “Hematological Disease” (Supplementary Table S14; Supplementary Figure 1D). IPA did not identify any biological function or canonical pathway significantly enriched for this set of transcripts.

Comparisons among the three combinations of CML-patient samples are illustrated in a Venn diagram (Figure 4). Figure 4A shows that a comparison between subgroup 1 (pre-R versus pre-NR) and subgroup 2 (pre-R versus post-NR) identified 11 protein-coding genes exclusively in common; among them were genes involved in apoptosis (*PAWR*), cell adhesion (*CD84*), and

regulation of translation (*IGF2BP3*) (Supplementary Table S15). Additionally, Figure 4B shows that 3 lncRNAs (*ncCHES1*, *ncPRKCB1*, and *ncRNPEP*) were identified in common between these two subgroups of patients (Supplementary Table S16). We found that most of the differentially expressed protein-coding genes identified in pre-treatment samples (11/19) were commonly identified in the subgroup containing post-treatment samples from NR relative to pre-treatment from R, suggesting that expression changes relating to resistance in NR after treatment have already been detected using only pre-treatment samples.

Figure 4A further shows that comparing subgroup 2 (pre-R versus post-NR) and subgroup 3 (pre-NR versus post-NR), a set of 76 protein-coding genes was in common (Supplementary Table S17). Examples included *ABCC3* (member of ATP-binding cassette transporters family) and *PTGS1* (prostaglandin-endoperoxide synthase 1). Additionally, 13 probes representing lncRNAs (Figure 4B) were found in common between these subgroups (Supplementary Table S18).

## Discussion

In this study, we identified sets of differentially expressed protein-coding genes and lncRNAs which might be related to mechanisms of resistance to dasatinib by comparing subgroups of PBMC samples collected from cytogenetic responders and non-responders.

Two of four patients who were resistant to dasatinib had F317L and G250E mutations detected in the BCR-ABL kinase domain. F317L mutation has been detected more frequently after treatment with dasatinib and associated with resistance [35, 36]. Since in this study only those transcripts that appeared in 100% of the gene lists identified by SAM and patient leave-one-out approaches were considered, our findings indicate common mechanisms involved in development of resistance in mutated and non-mutated patients.

We identified five exclusive differentially expressed protein-coding genes between pre-dasatinib PBMC samples from responders and non-responders. The low number of differentially expressed transcripts found between pre-treatment samples from R and NR probably was due to homogeneity of cells of patients with imatinib-resistant disease. Two out of the five protein-coding genes, TCR gamma alternate reading frame protein (*TARP*) and 15-Lipoxygenase 2 (*ALOX15B*) have been described with altered expression in prostate cancer cells [37, 38]. One of the two sense lncRNAs identified as differentially expressed in pre-dasatinib samples from R and NR maps to the genomic locus of *MYLIP*, a protein-coding gene with a potential tumor suppressor role in human leukemias. *MYLIP* is a target of miR-106-363 cluster, whose overexpression was found in T-cell leukemia [39].

In addition to the above exclusive differentially expressed transcripts, a subset of 11 protein-coding genes and 3 ncRNAs were found in common between pre-treatment R versus pre-treatment NR (subgroup 1) and pre-treatment R versus post-treatment NR (subgroup 2). An example, *PAWR*, a pro-apoptotic tumor suppressor protein was detected as down-regulated in the present study as well as in a variety of cancers, including acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia [40]. In another study, transformation caused by p185<sup>BCR-ABL</sup>-mediated signaling was abrogated by the expression of *PAWR* in hematopoietic cells [41].

Next, we compared pre-dasatinib samples from R with post-dasatinib samples from NR (subgroup 2) to identify changes in gene expression that might be related to emergence of resistance during treatment. Among the overexpressed protein-coding genes in NR patients, is *ABCF2*, a gene encoding a member of the superfamily of ATP-binding cassette transporters. In fact, drug efflux mediated by ABC transporters is a known mechanism of drug resistance. *ABCF2* was previously found to be up-regulated in post-chemotherapy ovarian cancers resistant to treatment as compared to corresponding primary untreated tumor sample [42].

Genes identified in this subgroup were further evaluated for functional relevance with Ingenuity Pathway Analysis. Transcripts involved in adhesion of cells and identified within the functional category “Cell-to-Cell Signaling and Interaction” were the most frequent (26/41 genes;  $p = 1.94E-03$ ). Cell adhesion-related genes were also included in gene expression signatures of resistant patients in several studies investigating primary cytogenetic resistance to imatinib [14, 16, 17]. Particularly, we detected underexpression of the protein-coding gene *THBS1* related to platelet aggregation and other two protein-coding genes (*THBD* and *TFPI*) whose products are involved in the coagulation process. In fact, bleeding is one of the adverse effects that have been observed in patients treated with dasatinib. An association between dasatinib and dysfunction in primary hemostasis has recently been shown [43]. Adverse events are correlated to off-target effects, which are effects not mediated by the assumed biochemical mechanism of inhibition. Many commonly used kinase inhibitors exhibit off-target activities [44]. On the other hand, novel off-target effects of dasatinib were observed in a study with thyroid cancer cell lines exerting potent cytostatic effect on these cells by G1 arrest and senescence. Also, microarrays analysis revealed changes in the expression profile of genes related to cell adhesion [45]. Taking into account these observations, it is conceivable that transcription of part of the genes and ncRNAs identified in this subgroup may be regulated by off-target events.

For lncRNAs functional analyses, we considered the host protein-coding gene from the genomic locus where a differentially expressed lncRNA was detected. These analyses are done in the assumption that a lncRNA may regulate the protein-coding gene in cis, e.g. affecting alternative splicing, transport or translation of the protein-coding message [21, 46] or may regulate genes in the downstream pathways of the host protein-coding gene [47].

The top-high function identified by IPA analyses of the differentially expressed lncRNAs in the comparison between pre-dasatinib samples from R with post-dasatinib samples from NR patients was “Cell Death”. In fact, inhibition of apoptosis is one of the mechanisms involved in

CML pathogenesis, which also includes decreased cell adhesion of immature hematopoietic progenitors to bone marrow microenvironment and constitutively active mitogenic signaling [48]. Among the transcripts identified in “Cell Death” category, the antisense lncRNA from the *CD44* gene locus was found overexpressed in dasatinib-resistant patients. Its corresponding protein-coding gene was identified with increased expression in imatinib- and PD166326-resistant CML cell lines [49].

Interestingly, “Cell Death” was among the categories identified by Gene Ontology and IPA tools as significantly enriched for protein-coding genes differentially expressed between pre- and post-treatment samples from NR patients (Supplementary Tables S10 and S11). Two genes identified in this category, *IFNG* and *FASLG*, were included in a study that associated diverse gene SNPs with response to imatinib [50]. Overexpression of another gene, *AKT1*, in non-responders after treatment suggests reactivation of PI3kinase pathway, one of the multiple signaling pathways induced by BCR-ABL that lead to proliferation and suppression of apoptosis [48, 51]. Accordingly, Akt kinase was found activated in dasatinib- and imatinib-resistant K562 cells [52]. Also, in the comparison of protein-coding genes between pre- and post-treatment samples from NR patients, the two most highly significantly enriched canonical pathways were related to the roles of kinases in viral infection and interferon signaling, involving *AKT1*, *IFNG*, *STAT1* and *TYK2* (Supplementary Table S12). Interestingly, in some patients with advanced CML, high-dose dasatinib therapy may be associated with opportunistic infections due to Epstein-Barr virus and *Pneumocystis jiroveci* [53].

Using IPA tools, several gene networks were identified as significantly enriched with differentially expressed genes in NR after treatment in relation to either R or NR pre-treatment. In both analyses, “Cell-to-Cell Signaling and Interaction” was included in the most significant network (Supplementary Tables S4 and S13). Likewise, analyses considering the protein-coding

genes from the same genomic loci as those of the differentially expressed lncRNAs, revealed genes related to “Cancer” amongst the significant networks (Supplementary Tables S7 and S14).

Previous publications have shown that key biological pathways are deregulated in CML patients with cytogenetic resistance to imatinib by processes involving BCR-ABL-dependent and -independent mechanisms [14, 15, 17]. Given that imatinib and dasatinib were suggested to target a common number of genes and pathways [54], resistance to these ABL kinase inhibitors seems to be a multifactorial mechanism, affecting a diversity of biological relevant genes.

In conclusion, we identified sets of lncRNA and protein-coding genes that were differentially expressed in cytogenetic responders and non-responders to dasatinib and may be associated with mechanisms of resistance. Noteworthy, identification of altered lncRNA expression suggests the involvement of lncRNAs in regulatory processes that are open for further investigation.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Diane Healey from Bristol-Myers Squibb for providing mutational status of ABL kinase domain of two non-responder patients. We also thank Raquel S. Foglio for the English revision of the manuscript.

## References

- [1] Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876-80.
- [2] Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002;99:3472-5.
- [3] Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002;2:117-25.
- [4] White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venable A, Zrim S, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 2007;110:4064-72.
- [5] Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003;101:690-8.
- [6] Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem* 2004;279:34227-39.
- [7] Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004;47:6658-61.
- [8] Cortes J, Rousselot P, Kim DW, Ritchie E, Hamerschlak N, Coutre S, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 2007;109:3207-13.
- [9] Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008;22:1200-6.
- [10] Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, et al. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest* 2007;117:2562-9.
- [11] Cortes J, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, et al. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2007;110:4005-11.
- [12] Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, et al. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. *Blood* 2007;115:1049-53.
- [13] Kaneta Y, Kagami Y, Katagiri T, Tsunoda T, Jin-nai I, Taguchi H, et al. Prediction of sensitivity to STI571 among chronic myeloid leukemia patients by genome-wide cDNA microarray analysis. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:849-56.
- [14] Villuendas R, Steegmann JL, Pollan M, Tracey L, Granda A, Fernandez-Ruiz E, et al. Identification of genes involved in imatinib resistance in CML: a gene-expression profiling approach. *Leukemia* 2006;20:1047-54.
- [15] Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, et al. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006;20:1400-7.

- [16] McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, Vartanian K, Willis SG, Yochum G, et al. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood* 2010;115:315-25.
- [17] McLean LA, Gathmann I, Capdeville R, Polymeropoulos MH, Dressman M. Pharmacogenomic analysis of cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Clin Cancer Res* 2004;10:155-65.
- [18] Huang F, Reeves K, Han X, Fairchild C, Platero S, Wong TW, et al. Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Res* 2007;67:2226-38.
- [19] Wang XD, Reeves K, Luo FR, Xu LA, Lee F, Clark E, et al. Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol* 2007;8:R255.
- [20] Perez DS, Hoage TR, Pritchett JR, Ducharme-Smith AL, Halling ML, Ganapathiraju SC, et al. Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer. *Hum Mol Genet* 2008;17:642-55.
- [21] Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* 2009;93:291-8.
- [22] Fabbri M, Garzon R, Andreeff M, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Calin GA. MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia* 2008;22:1095-105.
- [23] Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood* 2009;114:4761-70.
- [24] Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, Almeida GT, et al. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* 2004;23:6684-92.
- [25] Brito GC, Fachel AA, Vettore AL, Vignal GM, Gimba ER, Campos FS, et al. Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma. *Mol Carcinog* 2008;47:757-67.
- [26] Colombo J, Fachel AA, De Freitas Calmon M, Cury PM, Fukuyama EE, Tajara EH, et al. Gene expression profiling reveals molecular marker candidates of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009;21:649-63.
- [27] Tahira AC, Kubrusly MS, Faria MF, Dazzani B, Fonseca RS, Maracaja-Coutinho V, et al. Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2011;10:141.
- [28] Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Rea D, Dorlhiac-Llacer PE, Milone JH, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:3204-12.
- [29] Kantarjian H, Cortes J, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, Pasquini R, DiPersio J, et al. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood* 2009;113:6322-9.
- [30] Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, et al. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol* 2007;8:R43.
- [31] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;19:185-93.
- [32] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116-21.

- [33] Molinaro AM, Simon R, Pfeiffer RM. Prediction error estimation: a comparison of resampling methods. *Bioinformatics* 2005;21:3301-7.
- [34] Beisvag V, Junge FK, Bergum H, Jolsum L, Lydersen S, Gunther CC, et al. GeneTools--application for functional annotation and statistical hypothesis testing. *BMC Bioinformatics* 2006;7:470.
- [35] Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Castagnetti F, Rosti G, Bosi C, et al. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica* 2007;92:401-4.
- [36] Jabbour E, Kantarjian HM, Jones D, Reddy N, O'Brien S, Garcia-Manero G, et al. Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with F317L BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2008;112:4839-42.
- [37] Fritzsche FR, Stephan C, Gerhardt J, Lein M, Hofmann I, Jung K, et al. Diagnostic and prognostic value of T-cell receptor gamma alternative reading frame protein (TARP) expression in prostate cancer. *Histol Histopathol* 2010;25:733-9.
- [38] Tang S, Bhatia B, Maldonado CJ, Yang P, Newman RA, Liu J, et al. Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:16189-201.
- [39] Landais S, Landry S, Legault P, Rassart E. Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia. *Cancer Res* 2007;67:5699-707.
- [40] Zhao Y, Rangnekar VM. Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1867-74.
- [41] Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Chow KU, Bergmann M, Ruthardt M, Hoelzer D, et al. Prostate apoptosis response gene-4 (par-4) abrogates the survival function of p185(BCR-ABL) in hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2004;32:649-56.
- [42] L'Esperance S, Popa I, Bachvarova M, Plante M, Patten N, Wu L, et al. Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol* 2006;29:5-24.
- [43] Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G, et al. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer* 2009;115:2482-90.
- [44] Anastassiadis T, Deacon SW, Devarajan K, Ma H, Peterson JR. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2012;29:1039-45.
- [45] Chan D, Tyner JW, Chng WJ, Bi C, Okamoto R, Said J, et al. Effect of dasatinib against thyroid cancer cell lines in vitro and a xenograft model in vivo. *Oncol Lett* 2012;3:807-15.
- [46] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009;136:629-41.
- [47] Hill AE, Hong JS, Wen H, Teng L, McPherson DT, McPherson SA, et al. Micro-RNA-like effects of complete intronic sequences. *Front Biosci* 2006;11:1998-2006.
- [48] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-56.
- [49] Grosso S, Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquelin A, Lebrigand K, et al. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1924-33.
- [50] Kim DH, Kong JH, Byeun JY, Jung CW, Xu W, Liu X, et al. The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2010;16:5339-50.
- [51] Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995;86:726-36.

- [52] Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. Characteristics of dasatinib- and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2008;14:6181-6.
- [53] Sillaber C, Herrmann H, Bennett K, Rix U, Baumgartner C, Bohm A, et al. Immunosuppression and atypical infections in CML patients treated with dasatinib at 140 mg daily. *Eur J Clin Invest* 2009;39:1098-109.
- [54] Nunoda K, Tauchi T, Takaku T, Okabe S, Akahane D, Sashida G, et al. Identification and functional signature of genes regulated by structurally different ABL kinase inhibitors. *Oncogene*. 2007;26:4179-88.

## Figure Legends

**Figure 1** Supervised gene expression analysis of CML PBMC pre-treatment samples. Panel (A) shows five protein-coding genes and panel (B) two lncRNAs that were differentially expressed between pre-treatment samples from responders and non-responders. Cytogenetic response status was determined after 1 year of dasatinib therapy. Each row represents one gene (gene symbols are indicated) and each column represents a patient sample whose ID is indicated at the bottom. The colors red and blue indicate expression levels, respectively, above and below the average value of that gene across all samples; color intensity is proportional to the number of standard deviations above or below the average value of that gene across all samples.

**Figure 2** Supervised gene expression analysis of CML PBMC samples associated with resistance to dasatinib. Panel (A) shows 285 protein-coding genes and panel (B) shows 97 lncRNAs that were differentially expressed between pre-treatment samples from responders and post-treatment samples from non-responders after 1 year of therapy. Each row represents one gene and each column represents a patient sample whose ID is indicated at the bottom. The colors red and blue indicate expression levels, respectively, above and below the average value of that gene across all samples; color intensity is proportional to the number of standard deviations above or below the average value of that gene across all samples.

**Figure 3** Supervised gene expression analysis of CML PBMC pre- and post-treatment samples from non-responders to dasatinib. Panel (A) shows 268 protein-coding genes and panel (B) shows 83 lncRNAs that were differentially expressed between pre- and post-treatment samples from non-responders after 1 year of therapy. Each row represents one gene and each column represents a patient sample whose ID is indicated at the bottom. The colors red and blue indicate expression levels, respectively, above and below the average value of that gene across all samples; color intensity is proportional to the number of standard deviations above or below the average value of that gene across all samples.

**Figure 4** Venn diagrams showing differentially expressed transcripts identified by the three different comparisons of CML-patient samples. (A) protein-coding genes identified with the Whole Human Genome G4112F Microarray. (B) lncRNAs identified with a custom oligoarray. Groups (1) to (3) correspond to the patient sample comparisons indicated in the box.

Figure 1

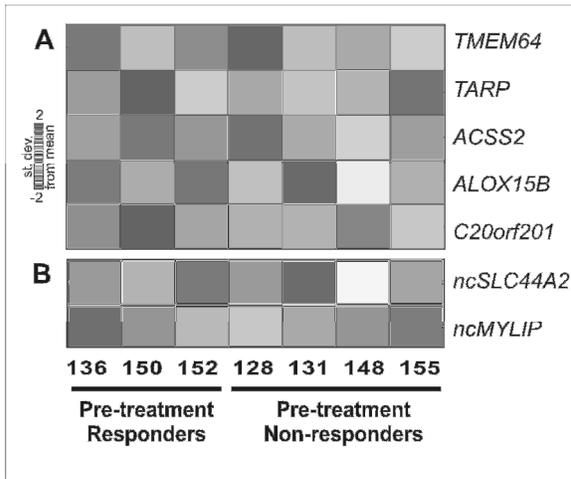


Figure 2

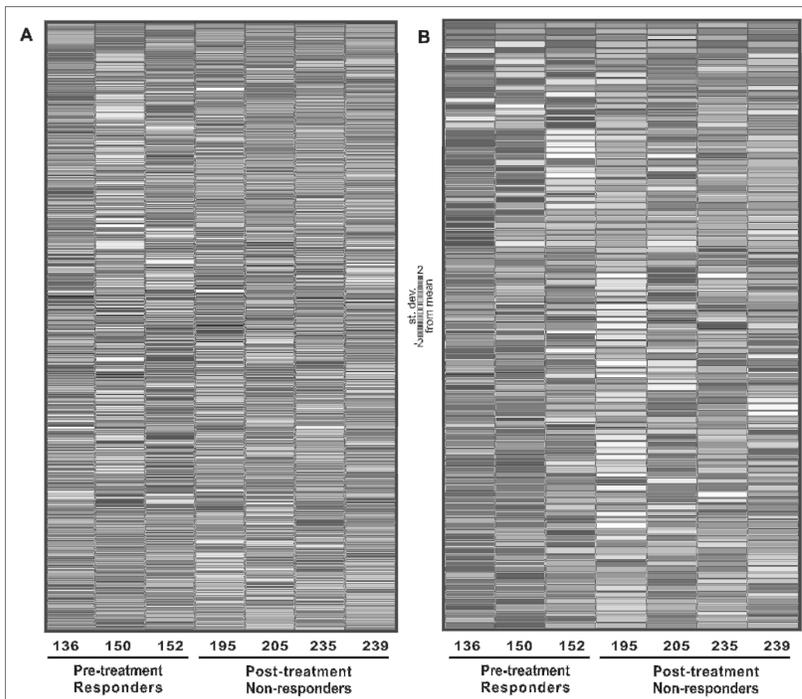


Figure 3

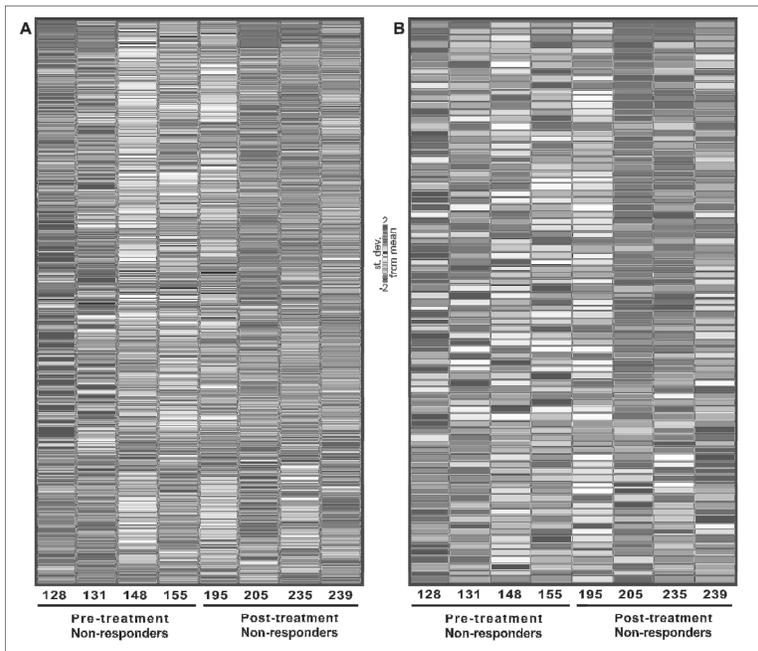
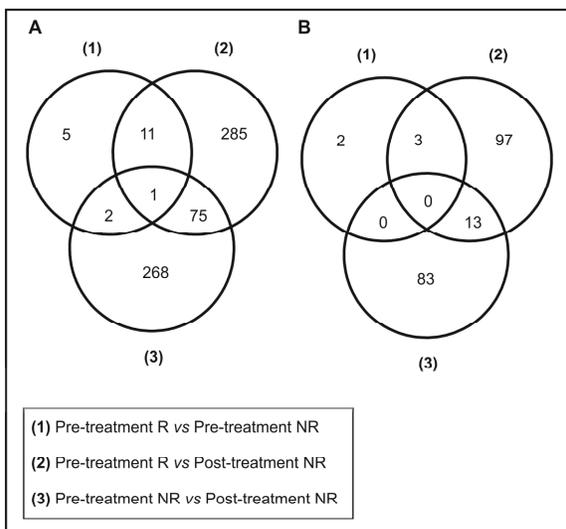


Figure 4



## Table Legends

### Table 1

WBC, white blood cell; HU, hydroxyurea; IFN, interferon- $\alpha$ ; IM, imatinib mesylate; araC, Ara-C-cytarabine; ASCT, autologous stem cell transplantation; ND, not detected; NA, not available.

### Table 2

<sup>a</sup> q-value represents a False Discovery Rate (FDR) for each gene calculated with Statistical Analysis of Microarrays (SAM) method.

<sup>b</sup> Fold change is calculated as the ratio of mean expression values for non-responders (NR) over responders (R).

Positive or negative signs correspond, respectively, to transcripts being overexpressed or underexpressed in non-responders in relation to responders.

### Table 3

<sup>a</sup> Probe type: S-TIN, sense totally intronic lncRNA.

<sup>b</sup> q-value represents a False Discovery Rate (FDR) for each gene calculated with Statistical Analysis of Microarrays (SAM) method.

<sup>c</sup> Fold change is calculated as the ratio of mean expression values for non-responders (NR) over responders (R).

Positive or negative signs correspond, respectively, to transcripts being overexpressed or underexpressed in non-responders in relation to responders.

### Table 4

<sup>a</sup> q-value represents a False Discovery Rate (FDR) for each gene calculated with Statistical Analysis of Microarrays (SAM) method.

<sup>b</sup> Fold change is calculated as the ratio of mean expression values for non-responders (NR) over responders (R).

Positive or negative signs correspond, respectively, to transcripts being overexpressed or underexpressed in non-responders in relation to responders.

**Table 1**  
Clinical and hematological data for 7 dasatinib-treated CML patients.

Patient ID	Responders			Non-responders			
	136	150	152	128	131	148	155
Gender	F	M	F	M	M	F	M
Age (yrs)	39	25	34	65	66	63	59
Hematological WBC count, X 10 <sup>9</sup> /L	7.12	7.18	70	6.24	4.88	10.32	4.73
Peripheral basophils (%)	2	3.7	12	3	1	4	0.3
Peripheral eosinophils (%)	2.6	3.3	2	4	1	1	1.6
Segmented neutrophils	66.1	54.6	62	66	55	44	73.3
Monocytes (%)	4.3	4.4	3	15	9	6	6.9
Lymphocytes (%)	23.1	30.5	10	10	33	9	16.1
Hemoglobin (g/dl)	11.7	15.9	10.8	12.1	12	10.6	13.1
Peripheral blasts (%)	0	0	1	0	0	4	0
Platelets count, X 10 <sup>9</sup> /L	484	195	2514	205	118	193	203
Treatments prior to dasatinib	HU, IFN, IM	HU, IFN, araC, ASCT, IM	HU, IFN, araC, IM	HU, IFN, IM	HU, IFN, IM	HU, IFN, araC, IM	HU, IFN, araC, IM
Mutations detected before dasatinib treatment	ND	ND	ND	G250E	F317L	ND	ND
Mutations detected after dasatinib treatment	ND	ND	ND	NA	F317L	ND	ND
Ph+ metaphases before dasatinib treatment (%)	100	75	100	100	100	100	100
Ph+ metaphases after dasatinib treatment (%)	0	0	30	95	100	90	100
Additional cytogenetic abnormalities after dasatinib treatment	8+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

**Table 2**

Five protein-coding genes differentially expressed between Pre-treatment samples from R and NR patients.

Entrez GeneID	Gene Symbol	Description	<sup>a</sup> q-value (%)	<sup>b</sup> Fold Change
198437	C20orf201	chromosome 20 open reading frame 201	0.39	2.21
55902	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	2.68	2.10
247	ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase, type B	4.89	2.09
169200	TMEM64	transmembrane protein 64	0.00	-2.09
445347	TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	0.00	-2.17

**Table 3**

Two lncRNAs differentially expressed between Pre-treatment samples from R and NR patients.

Host Entrez GeneID	Host Gene Symbol	Host Gene Description	<sup>a</sup> Probe Type	<sup>b</sup> q-value (%)	<sup>c</sup> Fold Change
29116	MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein	S-TIN	0	-1.59
57153	SLC44A2	solute carrier family 44, member 2	S-TIN	9.93	-1.55

**Table 4**

Top 50 overexpressed protein-coding genes in Post-treatment samples from NR patients relative to Pre-treatment samples from R patients.

Entrez GeneID	Gene Symbol	Description	<sup>a</sup> q-value (%)	<sup>b</sup> Fold Change
7941	PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	0.89	4.16
8685	MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	2.31	3.44
912	CD1D	CD1d molecule	2.31	3.29
220323	OAF	OAF homolog (Drosophila)	1.16	3.28
6038	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4	4.07	3.11
94015	TTYH2	tweety homolog 2 (Drosophila)	3.72	3.11
4950	OCLN	occludin	0.62	2.97
54504	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic- like	2.74	2.89
9563	H6PD	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	4.22	2.79
4938	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	3.42	2.64
5660	PSAP	prosaposin	2.99	2.60
4261	CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator	2.74	2.59
7172	TPMT	thiopurine S-methyltransferase	4.07	2.57
1519	CTSO	cathepsin O	2.74	2.52
	<i>A_24_P170136</i>	GB	1.31	2.50
5276	SERPINI2	serpin peptidase inhibitor, clade I (pancpin), member 2	1.92	2.47
733	C8G	complement component 8, gamma polypeptide	2.74	2.47
1520	CTSS	cathepsin S	2.52	2.46
29979	UBQLN1	ubiquilin 1	4.07	2.43
8942	KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	0.68	2.36
	<i>A_23_P113645</i>	non-RefSeq gene	4.22	2.36
8687	KRT38	keratin 38	4.22	2.35
3084	NRG1	neuregulin 1	4.07	2.34
303	ANXA2P1	annexin A2 pseudogene 1	1.64	2.31
	<i>A_32_P137408</i>	non-RefSeq gene	4.22	2.30
	<i>A_23_P430411</i>	Integrin beta-2 Precursor	2.31	2.30
53834	FGFRL1	fibroblast growth factor receptor-like 1	2.31	2.29
1777	DNASE2	deoxyribonuclease II, lysosomal	3.42	2.26
114294	LACTB	lactamase, beta	2.31	2.24
5229	PGGT1B	protein geranylgeranyltransferase type I,	0.20	2.22

		beta subunit		
8455	ATRN	attractin	1.01	2.22
4035	LRP1	low density lipoprotein-related protein 1(alpha-2-macroglobulin receptor)	3.27	2.20
10061	ABCF2	ATP-binding cassette, sub- family F (GCN20), member 2	3.42	2.20
64072	CDH23	cadherin-like 23	3.42	2.20
57864	SLC46A2	solute carrier family 46, member 2	0.35	2.19
10871	CD300C	CD300c molecule	0.64	2.19
5780	PTPN9	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	2.31	2.17
90956	ADCK2	aarF domain containing kinase 2	3.42	2.17
166929	SGMS2	sphingomyelin synthase 2	4.22	2.14
3126	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	3.42	2.14
7358	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	4.22	2.14
1029	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	2.83	2.13
334	APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	2.31	2.12
128866	CHMP4B	chromatin modifying protein 4B	1.16	2.12
2859	GPR35	G protein-coupled receptor 35	2.74	2.10
51338	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	3.25	2.09
64925	CCDC71	coiled-coil domain containing 71	2.31	2.08
197342	EME2	essential meiotic endonuclease 1 homolog 2 (S. pombe)	4.07	2.07
	<i>BU173515</i>	AGENCOURT_7936430 NIH_ MGC_71 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6174569	2.31	2.06
	<i>A_24_P937734</i>	non-RefSeq gene	1.16	2.06

# Apêndices 2 -12

(Material Eletrônico - CD-ROM)

**- TESE DE DOUTORADO -**

Avaliação da resistência aos inibidores de tirosinoquinases em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica pela pesquisa de mutações do gene *BCR-ABL* e análise do perfil de expressão gênica de pacientes tratados com imatinibe e dasatinibe.

**ROSANA ANTUNES DA SILVEIRA**



**2013**

**APÊNDICE 2.** Lista dos 285 genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe.

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
7941	PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	0,89	4,16
8685	MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	2,31	3,44
912	CD1D	CD1d molecule	2,31	3,29
220323	OAF	OAF homolog (Drosophila)	1,16	3,28
6038	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4	4,07	3,11
94015	TTYH2	tweety homolog 2 (Drosophila)	3,72	3,11
4950	OCLN	Occludin	0,62	2,97
54504	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like	2,74	2,89
9563	H6PD	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	4,22	2,79
4938	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	3,42	2,64
5660	PSAP	prosaposin	2,99	2,60
4261	CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator	2,74	2,59
7172	TPMT	thiopurine S-methyltransferase	4,07	2,57
1519	CTSO	cathepsin O	2,74	2,52
-	A_24_P170136	GB	1,31	2,50
5276	SERPINI2	serpin peptidase inhibitor, clade I (pancpin), member 2	1,92	2,47
733	C8G	complement component 8, gamma polypeptide	2,74	2,47
1520	CTSS	cathepsin S	2,52	2,46
29979	UBQLN1	ubiquilin 1	4,07	2,43
8942	KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	0,68	2,36
-	A_23_P113645	mRNA for voltage gated potassium channels, beta subunit	4,22	2,36
8687	KRT38	keratin 38	4,22	2,35

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	<i>q-value</i> <sup>*</sup>	<i>Fold Change</i> <sup>‡</sup>
3084	NRG1	neuregulin 1	4,07	2,34
303	ANXA2P1	annexin A2 pseudogene 1	1,64	2,31
-	A_32_P137408	non-RefSeq gene	4,22	2,30
-	A_23_P430411	Integrin beta-2 Precursor	2,31	2,30
53834	FGFRL1	fibroblast growth factor receptor-like 1	2,31	2,29
1777	DNASE2	deoxyribonuclease II, lysosomal	3,42	2,26
114294	LACTB	lactamase, beta	2,31	2,24
5229	PGGT1B	protein geranylgeranyltransferase type I, beta subunit	0,20	2,22
8455	ATRN	attractin	1,01	2,22
4035	LRP1	low density lipoprotein-related protein 1(alpha-2-macroglobulin receptor)	3,27	2,20
10061	ABCF2	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2	3,42	2,20
64072	CDH23	cadherin-like 23	3,42	2,20
57864	SLC46A2	solute carrier family 46, member 2	0,35	2,19
10871	CD300C	CD300c molecule	0,64	2,19
5780	PTPN9	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	2,31	2,17
90956	ADCK2	aarF domain containing kinase 2	3,42	2,17
166929	SGMS2	sphingomyelin synthase 2	4,22	2,14
3126	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	3,42	2,14
7358	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	4,22	2,14
1029	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	2,83	2,13
334	APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	2,31	2,12
128866	CHMP4B	chromatin modifying protein 4B	1,16	2,12
2859	GPR35	G protein-coupled receptor 35	2,74	2,10
51338	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	3,25	2,09
64925	CCDC71	coiled-coil domain containing 71	2,31	2,08
197342	EME2	essential meiotic endonuclease 1 homolog 2 (S. pombe)	4,07	2,07

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
-	BU173515	AGENCOURT_7936430 NIH_MGC_71 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6174569 5', mRNA sequence	2,31	2,06
-	A_24_P937734	non-RefSeq gene	1,16	2,06
54978	C2orf18	chromosome 2 open reading frame 18	0,89	2,05
123041	SLC24A4	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 4	1,92	2,05
64750	SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	0,26	2,04
834	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	1,92	2,02
-	A_32_P230838	non-RefSeq gene	4,22	2,01
8939	FUBP3	far upstream element (FUSE) binding protein 3	2,30	2,01
-	AI820751	yj85b12.y5 Soares breast 2NbHBst Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 155519 5' similar to gb	3,25	2,01
55959	SULF2	sulfatase 2	0,89	2,00
25932	CLIC4	chloride intracellular channel 4	0	-2,00
-	A_24_P910381	non-RefSeq gene	3,34	-2,01
10677	AVIL	advillin	0,23	-2,01
2876	GPX1	glutathione peroxidase 1	1,64	-2,02
284085	FLJ40504	keratin 18 pseudogene	0,26	-2,02
3655	ITGA6	integrin, alpha 6	2,31	-2,02
-	BX537432	mRNA; cDNA DKFZp686N09198)	1,34	-2,02
286006	C7orf53	chromosome 7 open reading frame 53	0,04	-2,03
3892	KRT86	keratin 86	0,57	-2,04
4673	NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	4,07	-2,04
81567	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5 (endoplasmic reticulum)	0,46	-2,04
375449	MAST4	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4	1,64	-2,05
4953	ODC1	ornithine decarboxylase 1	0	-2,05
9910	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	0	-2,05

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
93663	ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18	0,46	-2,06
3280	HES1	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	3,42	-2,06
96626	LIMS3	LIM and senescent cell antigen-like domains 3	2,74	-2,06
23429	RYBP	RING1 and YY1 binding protein	0	-2,07
1300	COL10A1	collagen, type X, alpha 1	0,57	-2,08
-	BC001556	Homo sapiens, clone IMAGE:3464359,mRNA	0,62	-2,08
-	A_23_P256618	non-RefSeq gene	1,74	-2,08
-	XM_001714030	Ig kappa chain V-I region Walker Precursor [Source: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P04431]	0,10	-2,08
-	A_32_P162494	non-RefSeq gene	2,74	-2,08
-	A_24_P24053	Putative uncharacterized protein ENSP00000375041 [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NFJ8]	4,22	-2,08
1601	DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	0	-2,09
10638	SPHAR	S-phase response (cyclin related)	0,22	-2,09
7035	TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein- associated coagulation inhibitor)	0	-2,10
-	BC036424	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4798730	0	-2,10
8727	CTNNAL1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	2,25	-2,10
	BF238843	601904455F1 NIH_MGC_54 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4132429 5', mRNA sequence	1,01	-2,10
60485	SAV1	salvador homolog 1 (Drosophila)	0,83	-2,10
10634	GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1	0,68	-2,12
-	A_24_P350060	non-RefSeq gene	0	-2,12
-	A_24_P918875	non-RefSeq gene	0,88	-2,13
54498	SMOX	spermine oxidase	0,62	-2,13
10554	AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)	0	-2,14

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
23591	C17orf88	chromosome 17 open reading frame 88	1,64	-2,14
-	A_23_P122650	non-RefSeq gene	0,62	-2,14
-	CR610181	full-length cDNA clone CS0DM006YA12 of Fetal liver of Homo sapiens (human)	0	-2,14
1269	CNR2	cannabinoid receptor 2	1,39	-2,15
55793	FAM63A	(macrophage) family with sequence similarity 63, member A	2,74	-2,15
-	X57818	V2-1 protein Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A0M8Q7]	3,42	-2,16
-	XM_002345544	Putative uncharacterized protein ENSP00000374805 [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NLY3]	3,72	-2,17
10666	CD226	CD226 molecule	0,23	-2,17
-	BC057844	Homo sapiens cDNA clone MGC:71846 IMAGE:5313492, complete cds	0	-2,18
3875	KRT18	keratin 18	0,39	-2,18
-	CR621698	full-length cDNA clone CS0DF030YF21 of Fetal brain of Homo sapiens (human)	1,64	-2,19
340508	LOC340508	hypothetical protein LOC340508	0	-2,19
91283	C9orf30	chromosome 9 open reading frame 30	3,08	-2,19
-	A_24_P281443	non-RefSeq gene	0,88	-2,20
442249	LOC442249	similar to keratin 18	0,44	-2,20
-	BC034142	Putative uncharacterized protein ENSP00000374801 [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NKP1]	3,42	-2,20
-	A_24_P746044	non-RefSeq gene	4,18	-2,21
-	A_24_P614579	non-RefSeq gene	0,83	-2,22
-	ES309363	F1236 Human cultured dermal papilla cell cDNA library(F) Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	2,74	-2,23
25909	AHCTF1	AT hook containing transcription factor 1	2,74	-2,23
23052	ENDOD1	endonuclease domain containing 1	0,88	-2,23

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
-	A_24_P25040	non-RefSeq gene	2,25	-2,24
55281	TMEM140	transmembrane protein 140	0	-2,24
-	A_24_P472081	V1-17 protein Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A2MYD0]	0,75	-2,24
-	A_32_P226605	non-RefSeq gene	4,07	-2,25
64407	RGS18	regulator of G-protein signaling 18	0,45	-2,25
92092	ZC3HAV1L	zinc finger CCCH-type, antiviral 1-like	2,71	-2,26
8871	SYNJ2	synaptojanin 2	3,72	-2,28
9623	TCL1B	T-cell leukemia/lymphoma 1B	4,07	-2,28
-	XR_078808	Ig heavy chain V-III region VH26 Precursor [Source: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P01764]	1,31	-2,29
7056	THBD	thrombomodulin	1,08	-2,29
51251	NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	0,23	-2,29
55831	TMEM111	transmembrane protein 111	0,46	-2,30
2766	GMPR	guanosine monophosphate reductase	0,62	-2,31
80230	RUFY1	RUN and FYVE domain containing 1	0	-2,31
-	A_24_P247233	non-RefSeq gene	0,54	-2,32
-	A_32_P192314	non-RefSeq gene	0,68	-2,32
-	XM_002345305	PREDICTED: Homo sapiens similar to DC48 (LOC100293563), mRNA	0,37	-2,33
-	A_32_P197333	non-RefSeq gene	0	-2,35
652494	LOC652494	similar to Ig heavy chain V-III region VH26 precursor	4,07	-2,35
9402	GRAP2	GRB2-related adaptor protein 2	1,60	-2,35
-	A_24_P230466	non-RefSeq gene	0,48	-2,35
8303	SNN	stannin	0,46	-2,35
-	A_32_P136450	non-RefSeq gene	1,31	-2,37
169200	TMEM64	transmembrane protein 64	0	-2,37
84886	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	0,23	-2,37
100289574	LOC100289574	hypothetical protein LOC100289574	0	-2,38

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
65982	ZSCAN18	zinc finger and SCAN domain containing 18	3,93	-2,38
-	A_32_P80532	non-RefSeq gene	4,07	-2,39
91319	DERL3	Der1-like domain family, member 3	0,57	-2,40
64423	INF2	inverted formin, FH2 and WH2 domain containing	0,46	-2,40
-	BX352604	BX352604 Homo sapiens B CELLS (RAMOS CELL LINE) COT 25-NORMALIZED Homo sapiens cDNA clone CS0DL006YE02 3-PRIME, mRNA sequence	4,18	-2,40
8334	HIST1H2AC	histone cluster 1, H2ac	2,25	-2,40
3559	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	4,07	-2,40
7739	ZNF185	zinc finger protein 185 (LIM domain)	0	-2,41
79904	FLJ11710	hypothetical protein FLJ11710	2,74	-2,46
50486	G0S2	G0/G1switch 2	3,72	-2,46
122416	ANKRD9	ankyrin repeat domain 9	0,22	-2,47
384	ARG2	arginase, type II	4,18	-2,48
-	A_32_P157927	Ig kappa chain V-IV region Precursor; Fragment [Source: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P06312]	0,84	-2,48
-	A_24_P349648	non-RefSeq gene	1,64	-2,49
-	A_24_P484904	non-RefSeq gene	1,94	-2,49
-	A_32_P118010	non-RefSeq gene	2,74	-2,50
-	A_23_P317056	non-RefSeq gene	1,01	-2,51
-	A_24_P109661	non-RefSeq gene	0	-2,51
25893	TRIM58	tripartite motif-containing 58	0,46	-2,52
55384	MEG3	maternally expressed 3 (non-protein coding)	4,07	-2,55
79689	STEAP4	STEAP family member 4	4,18	-2,55
-	A_24_P358305	non-RefSeq gene	0,22	-2,56
377677	CA13	carbonic anhydrase XIII	0,46	-2,59
4149	MAX	MYC associated factor X	0,42	-2,59

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
340205	TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	4,18	-2,61
84519	ACRBP	acrosin binding protein	0,22	-2,62
-	A_23_P96191	GB	1,16	-2,65
6532	SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	1,34	-2,65
79739	TTLL7	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	1,74	-2,66
25780	RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	0,57	-2,66
29967	LRP12	low density lipoprotein-related protein 12	1,34	-2,67
3563	IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	0,25	-2,67
-	XM_001715926	Putative uncharacterized protein ENSP00000375027 [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NGC3]	2,74	-2,67
-	A_24_P341126	non-RefSeq gene	0,10	-2,68
-	AK123333	Homo sapiens cDNA FLJ41339 fis, clone BRASW1000053	0	-2,69
26994	RNF11	ring finger protein 11	0,22	-2,70
57584	ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21	0,68	-2,70
-	A_23_P124632	non-RefSeq gene	3,42	-2,71
-	A_32_P55438	non-RefSeq gene	1,08	-2,76
100287723	LOC100287723	similar to Ig kappa chain	0,64	-2,77
-	A_32_P165407	non-RefSeq gene	2,74	-2,78
2952	GSTT1	glutathione S-transferase theta 1	1,03	-2,78
7850	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	1,16	-2,83
-	XM_002343472	Putative uncharacterized protein ENSP00000346720 [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NG04]	4,22	-2,84
2949	GSTM5	glutathione S-transferase mu 5	0	-2,84
8555	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)	0	-2,86
-	A_23_P72330	non-RefSeq gene	1,64	-2,87
84771	MGC13005	hypothetical LOC84771	1,34	-2,88
7171	TPM4	tropomyosin 4	0	-2,88

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
-	A_24_P538459	non-RefSeq gene	0,88	-2,89
8031	NCOA4	nuclear receptor coactivator 4	0,98	-2,90
26230	TIAM2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	0	-2,93
-	A_32_P116088	non-RefSeq gene	0,57	-2,94
-	XM_001719095	Ig kappa chain V-III region HAH Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P18135]	4,18	-2,96
-	X57802	V2-1 protein Fragment [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:A0M8Q7]	1,71	-2,96
90952	ESAM	endothelial cell adhesion molecule	2,71	-2,97
-	BG547872	Putative uncharacterized protein ENSP00000374801 [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NKP1]	0,54	-2,98
-	AF086288	Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD48A05 [AF086288]	0	-3,00
-	XM_002347488	Rheumatoid factor RF-IP14 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A2J1N0]	4,07	-3,01
152579	SCFD2	sec1 family domain containing 2	0	-3,01
100292427	LOC100292427	hypothetical protein LOC100292427	0,37	-3,03
81579	PLA2G12A	phospholipase A2, group XIIA	0,22	-3,03
-	XM_001717586	Rheumatoid factor RF-IP18 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A2J1N2]	4,07	-3,05
-	DQ225098	Putative uncharacterized protein ENSP00000374807 [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NIB6]	1,92	-3,05
-	AL355688	Homo sapiens EST from clone 208499, full insert	4,22	-3,05
7168	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	2,23	-3,06
222166	C7orf41	chromosome 7 open reading frame 41	0,82	-3,10
153643	FAM81B	family with sequence similarity 81, member B	0	-3,11
-	A_32_P76526	non-RefSeq gene	3,42	-3,13
51237	MGC29506	hypothetical protein MGC29506	1,34	-3,14

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
-	A_24_P182122	non-RefSeq gene	0	-3,14
150356	CHADL	chondroadherin-like	0,88	-3,15
-	A_24_P298805	Putative uncharacterized protein ENSP00000353216 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NIS9]	1,64	-3,16
64805	P2RY12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	2,31	-3,18
100287891	LOC100287891	hypothetical protein LOC100287891	1,34	-3,20
138311	FAM69B	family with sequence similarity 69, member B	1,74	-3,22
90853	SPOCD1	SPOC domain containing 1	0	-3,23
-	A_32_P30345	non-RefSeq gene	0,48	-3,23
-	A_23_P431853	non-RefSeq gene	0	-3,23
-	XM_002348112	Ig lambda chain V-IV region Bau [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P01715]	1,16	-3,23
3576	IL8	interleukin 8	2,71	-3,25
-	A_24_P229447	Putative uncharacterized protein ENSP00000353216 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:A6NIS9]	3,25	-3,26
2017	CTTN	cortactin	2,74	-3,26
-	A_24_P281853	non-RefSeq gene	0	-3,31
2162	F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	0,83	-3,32
79628	SH3TC2	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2	4,22	-3,33
22885	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3	0,46	-3,35
51266	CLEC1B	C-type lectin domain family 1, member B	3,72	-3,36
25825	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	0,68	-3,38
23531	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	0	-3,39
10867	TSPAN9	tetraspanin 9	0	-3,40
24141	C20orf103	chromosome 20 open reading frame 103	0,46	-3,41
57699	CPNE5	copine V	2,25	-3,45
80739	C6orf25	chromosome 6 open reading frame 25	0,46	-3,45

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
63027	SLC22A23	solute carrier family 22, member 23	1,94	-3,45
-	XM_002348112	Ig lambda chain V-IV region Bau [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P01715]	0,84	-3,50
-	BC067092	Ig kappa chain C region [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P01834]	0,64	-3,50
7057	THBS1	thrombospondin 1	4,18	-3,53
-	A_24_P453819	non-RefSeq gene	0,25	-3,55
5747	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	0,90	-3,56
-	AY339598	Homo sapiens clone P6-CL-25 anti-cardiolipin immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds	1,03	-3,60
3987	LIMS1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	0,46	-3,60
3565	IL4	interleukin 4	4,02	-3,62
79993	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0,23	-3,62
-	A_23_P21260	Ig kappa chain V-I region Walker Precursor [Source: UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P04431]	0,89	-3,63
91624	NEXN	nexilin (F actin binding protein)	2,71	-3,69
100289290	LOC100289290	similar to hCG2042717	1,92	-3,70
-	A_24_P639701	non-RefSeq gene	1,34	-3,72
219670	ENKUR	enkurin, TRPC channel interacting protein	1,21	-3,75
23581	CASP14	caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	3,42	-3,77
-	A_24_P24371	Ig gamma-4 chain C region [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P01861] [ENST00000390543]	2,31	-3,77
-	XM_001719095	Ig kappa chain V-III region CLL Precursor (Rheumatoid factor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P04207]	0,83	-3,78
-	NP861037	GB	0,89	-3,79
90139	TSPAN18	tetraspanin 18	0	-3,83
56953	NT5M	5',3'-nucleotidase, mitochondrial	0,46	-3,83
10158	PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	3,22	-3,86

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
10826	C5orf4	chromosome 5 open reading frame 4	0,83	-3,87
-	A_23_P350782	DNA rearranged by a t(2;8) translocation leading to Burkitt's lymphoma in the cell line JI (clone JIp) Fragment [Source: UniProtKB/TrEMBL; Acc:Q6LBV5]	0,89	-3,88
-	XM_001719095	Ig kappa chain V-III region VH Precursor; Fragment [Source: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P04434]	1,31	-3,89
642838	LOC642838	similar to hCG1742442	0,35	-3,90
-	A_24_P490109	non-RefSeq gene	0,22	-3,90
-	XM_001719095	Ig kappa chain V-III region CLL Precursor (Rheumatoid factor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P04207]	0,45	-3,91
2260	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	0,68	-3,92
3693	ITGB5	integrin, beta 5	0	-3,94
-	A_32_P224498	non-RefSeq gene	1,34	-3,94
-	A_23_P84791	non-RefSeq gene	0,84	-3,95
4900	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	0	-3,95
6622	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	0,91	-4,07
-	A_32_P145477	non-RefSeq gene	0,46	-4,14
928	CD9	CD9 molecule	1,08	-4,19
80763	C12orf39	chromosome 12 open reading frame 39	1,34	-4,32
-	A_24_P169873	Ig alpha-2 chain C region [Source: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:P01877]	0,64	-4,34
-	A_24_P204574	non-RefSeq gene	0	-4,38
7429	VIL1	villin 1	2,71	-4,41
-	AK128476	Ig alpha-1 chain C region [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P01876]	0	-4,45
3953	LEPR	leptin receptor	0,37	-4,49
55698	RADIL	Ras association and DIL domains	1,01	-4,76
-	A_23_P61042	Ig alpha-2 chain C region [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P01877]	1,03	-4,84
3081	HGD	homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase)	0,46	-5,12

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b><i>q-value</i><sup>*</sup></b>	<b><i>Fold Change</i><sup>‡</sup></b>
83700	JAM3	junctional adhesion molecule 3	0,34	-5,13
8654	PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	2,74	-5,16
30845	EHD3	EH-domain containing 3	0,37	-5,17
6374	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	1,54	-5,20
23362	PSD3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	0,88	-6,10

\* *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>‡</sup>*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

**APÊNDICE 3.** Lista dos 97 lncRNAs diferencialmente expressos exclusivos entre as amostras de pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe.

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
1112	CHES1	checkpoint suppressor 1	AS-TIN	8,42	2,97
7494	XBP1	X-box binding protein 1	AS-PIN	6,85	2,90
4292	MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	AS-TIN	6,08	2,63
3659	IRF1	interferon regulatory factor 1	AS-PIN	9,54	2,58
83608	C18orf21	chromosome 18 open reading frame 21	AS-PIN	7,24	2,47
79109	MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	AS-TIN	3,01	2,41
5861	RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family	AS-PIN	3,01	2,33
5046	PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	AS-TIN	5,03	2,29
55217	TMLHE	trimethyllysine hydroxylase, épsilon	S-TIN	5,22	2,27
26276	VPS33B	vacuolar protein sorting 33 homolog B (yeast)	S-TIN	4,74	2,20
5708	PSMD2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	AS-PIN	4,74	2,16
89122	TRIM4	tripartite motif-containing 4	S-TIN	9,54	2,15
8667	EIF3S3	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa	AS-PIN	3,01	2,14
9958	USP15	ubiquitin specific peptidase 15	S-TIN	9,54	2,14
1106	CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein 2	AS-TIN	3,15	2,10
334	APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	AS-PIN	8,42	2,10
7804	LRP8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	AS-TIN	8,42	2,06
54107	POLE3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	AS-TIN	6,85	2,04
157922	CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	AS-TIN	8,42	2,03

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
5660	PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	AS-PIN	4,74	2,01
63901	FAM111A	family with sequence similarity 111, member A	S-TIN	8,42	2,00
57704	GBA2	glucosidase, beta (bile acid) 2	AS-PIN	2,78	2,00
5660	PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	AS-PIN	5,22	2,00
147700	KLC3	kinesin light chain 3	AS-PIN	8,42	1,97
5861	RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family	AS-PIN	3,01	1,96
81550	TDRD3	tudor domain containing 3	AS-PIN	3,01	1,95
506	ATP5B	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	AS-PIN	6,08	1,95
6742	SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1	AS-PIN	7,24	1,88
4151	MB	myoglobin	AS-PIN	6,85	1,88
9791	PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1	S-TIN	9,54	1,87
11107	PRDM5	PR domain containing 5	AS-PIN	6,08	1,83
4125	MAN2B1	mannosidase, alpha, class 2B, member 1	AS-PIN	5,22	1,80
57142	RTN4	reticulon 4	S-TIN	9,54	1,78
55755	CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	AS-PIN	5,22	1,77
64005	MYO1G	myosin IG	AS-PIN	6,85	1,75
960	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	AS-PIN	8,42	1,71
4542	MYO1F	myosin IF	AS-PIN	3,94	1,70
138428	PTRH1	peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog (S. cerevisiae)	S-TIN	3,01	1,69
1997	ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	AS-PIN	9,54	1,69
64210	MMS19L	MMS19-like (MET18 homolog, S. cerevisiae)	AS-PIN	8,42	1,68
5573	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha(tissue specific extinguisher 1)	AS-PIN	9,54	1,68
3181	HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	AS-PIN	5,41	1,66

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
283383	GPR133	G protein-coupled receptor 133	S-TIN	6,85	1,66
7402	UTRN	utrophin	AS-PIN	8,42	1,66
80144	FRAS1	Fraser syndrome 1	S-TIN	6,85	1,65
192670	EIF2C4	eukaryotic translation initiation factor 2C, 4	S-TIN	8,42	1,64
5713	PSMD7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Mov34 homolog)	AS-PIN	9,34	1,63
1512	CTSH	cathepsin H	AS-PIN	8,42	1,63
10629	TAF6L	TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa	AS-PIN	2,78	1,63
90416	CCDC32	coiled-coil domain containing 32	AS-TIN	5,03	1,63
8826	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	AS-PIN	6,85	1,62
3181	HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	AS-PIN	5,93	1,61
11100	HNRPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	AS-PIN	5,93	1,61
10437	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	AS-PIN	9,54	1,59
80184	CEP290	centrosomal protein 290kDa	S-TIN	6,08	1,58
81605	URM1	ubiquitin related modifier 1 homolog (S. cerevisiae)	S-TIN	9,54	1,57
831	CAST	calpastatin	AS-PIN	9,54	1,53
221035	REEP3	receptor accessory protein 3	AS-TIN	8,42	1,52
1655	DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	AS-PIN	3,01	1,52
5603	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	AS-PIN	3,01	1,50
128553	TSHZ2	teashirt family zinc finger 2	AS-TIN	9,54	1,50
636	BICD1	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	S-TIN	6,08	-1,52
2315	MLANA	melan-A	AS-TIN	3,94	-1,59
5886	RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)	AS-PIN	5,22	-1,59
4297	MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	S-TIN	9,54	-1,59
80014	WWC2	WW and C2 domain containing 2	AS-TIN	9,40	-1,61

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
6678	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	AS-PIN	4,88	-1,64
488	ATP2A2	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	S-TIN	9,54	-1,64
51363	GALNAC4S-6ST	B cell RAG associated protein	S-TIN	1,82	-1,71
2766	GMPR	guanosine monophosphate reductase	AS-TIN	8,85	-1,74
25816	TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	AS-TIN	9,54	-1,75
2060	EPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15	S-TIN	5,96	-1,79
5175	PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	S-TIN	9,54	-1,82
81027	TUBB1	tubulin, beta 1	AS-PIN	6,30	-1,83
645	BLVRB	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	AS-TIN	5,09	-1,87
92335	LYK5	protein kinase LYK5	AS-PIN	8,42	-1,90
7052	TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	S-TIN	5,22	-1,94
7094	TLN1	talin 1	AS-PIN	3,23	-1,95
27130	INVS	inversin	S-TIN	4,74	-1,97
23648	SSBP3	single stranded DNA binding protein 3	AS-TIN	8,85	-1,99
55002	TMCO3	transmembrane and coiled-coil domains 3	S-TIN	5,38	-2,05
84441	MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	S-TIN	8,42	-2,12
9644	SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A	S-TIN	0	-2,19
4255	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	S-TIN	5,09	-2,22
51112	TTC15	tetratricopeptide repeat domain 15	AS-TIN	9,54	-2,24
4149	MAX	MYC associated factor X	AS-PIN	6,63	-2,26
5095	PCCA	propionyl Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	S-TIN	6,08	-2,27
1106	CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein 2	AS-PIN	7,41	-2,34
953	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	S-TIN	8,42	-2,51
6310	ATXN1	ataxin 1	AS-TIN	5,09	-2,60
288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	S-TIN	5,96	-2,71

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
7057	THBS1	thrombospondin 1	AS-PIN	8,23	-2,78
3983	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	S-TIN	9,54	-2,94
2309	FOXO3A	forkhead box O3A	AS-TIN	3,94	-3,03
84441	MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	S-TIN	8,42	-3,04
8714	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	AS-PIN	8,42	-3,24
60468	BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	S-TIN	8,42	-5,39

\*Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-TIN, lncRNA totalmente intrônico antisense; AS-PIN, lncRNA parcialmente intrônico antisense. <sup>‡</sup>q-value representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>§</sup>Fold Change é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

**APÊNDICE 4.** Lista dos 268 genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento e pós-tratamento de não responsivos ao dasatinibe.

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
3458	IFNG	interferon, gamma	3,30	3,82
356	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	2,14	3,28
1524	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	1,58	2,64
-	A_24_P16361	non-RefSeq gene	1,36	2,58
-	BX641014	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686I19109 (from clone DKFZp686I19109)	2,39	2,52
5775	PTPN4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 (megakaryocyte)	3,36	2,50
51478	HSD17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	0,25	2,49
-	A_24_P15702	non-RefSeq gene	3,61	2,47
407975	MIR17HG	MIR17 host gene (non-protein coding)	0,28	2,47
2643	GCH1	GTP cyclohydrolase 1	2,39	2,41
207	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	0,24	2,41
22914	KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	3,60	2,41
200081	TXLNA	taxilin alpha	0,24	2,39
-	A_24_P118813	non-RefSeq gene	1,71	2,37
26001	RNF167	ring finger protein 167	0,18	2,36
644019	CBWD6	COBW domain containing 6	2,90	2,33
53916	RAB4B	RAB4B, member RAS oncogene family	0,12	2,29
80143	SIKE1	suppressor of IKBKE 1	0,53	2,28
9760	TOX	thymocyte selection-associated high mobility group box	3,60	2,26
11119	BTN3A1	butyrophilin, subfamily 3, member A1	4,75	2,26
-	A_32_P82293	non-RefSeq gene	1,58	2,23
29925	GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B	0	2,23

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
83888	FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	3,90	2,23
10161	LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6	3,90	2,23
65084	TMEM135	transmembrane protein 135	0,69	2,22
9522	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	0,24	2,22
51447	IP6K2	inositol hexakisphosphate kinase 2	0,15	2,22
80789	INTS5	integrator complex subunit 5	0,99	2,21
64172	OSGEPL1	O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1	1,85	2,20
6772	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	3,61	2,19
5905	RANGAP1	Ran GTPase activating protein 1	0	2,19
-	A_32_P209104	non-RefSeq gene	1,26	2,18
6950	TCP1	t-complex 1	0,28	2,18
51527	C14orf129	chromosome 14 open reading frame 129	0,87	2,18
7297	TYK2	tyrosine kinase 2	0,12	2,17
5829	PXN	paxillin	0,69	2,17
345462	ZNF879	zinc finger protein 879	1,71	2,14
9784	SNX17	sorting nexin 17	0,53	2,13
79156	PLEKHF1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1	3,91	2,12
3597	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	0,28	2,10
6815	STYX	serine/threonine/tyrosine interacting protein	1,36	2,09
841	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	1,71	2,09
10866	HCP5	HLA complex P5	0	2,08
10607	TBL3	transducin (beta)-like 3	0,55	2,08
9632	SEC24C	SEC24 family, member C ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,53	2,08
55601	DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	0,65	2,07
27430	MAT2B	methionine adenosyltransferase II, beta	0,53	2,07
-	A_32_P65804	non-RefSeq gene	0,69	2,07

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
-	A_24_P383680	non-RefSeq gene	0,12	2,06
60489	APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	0,74	2,06
11186	RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	0,18	2,06
-	A_32_P134679	non-RefSeq gene	3,90	2,05
90624	LYRM7	Lym7 homolog (mouse)	2,02	2,05
4076	CAPRN1	cell cycle associated protein 1	2,35	2,05
643668	LOC643668	similar to protease (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 1	0,38	2,05
80219	COQ10B	coenzyme Q10 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,38	2,04
3001	GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	3,90	2,04
-	A_24_P15803	non-RefSeq gene	4,18	2,04
57704	GBA2	glucosidase, beta (bile acid) 2	0,28	2,04
7559	ZNF12	zinc finger protein 12	0,18	2,03
-	A_24_P324644	non-RefSeq gene	1,06	2,02
23417	MLYCD	malonyl-CoA decarboxylase	0,28	2,02
90864	SPSB3	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 3	0	2,02
23780	APOL2	apolipoprotein L, 2	1,71	2,02
80777	CYB5B	cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	0,71	2,02
92342	C1orf156	chromosome 1 open reading frame 156	0,53	2,02
100133050	LOC100133050	glucuronidase, beta pseudogene	0,53	2,01
64853	AINDA	axin interactor, dorsalization associated	0,91	2,01
-	A_24_P41540	non-RefSeq gene	0,71	2,01
56674	TMEM9B	TMEM9 domain family, member B	0,12	2,01
-	A_24_P924185	non-RefSeq gene	1,95	-2,00
-	CD674787	fs15c03.y2 Human Lens cDNA (Normalized): fs Homo sapiens cDNA clone fs15c03 5', mRNA sequence	0,53	-2,00

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
-	AK022443	Homo sapiens cDNA FLJ12381 fis, clone MAMMA1002566	0	-2,01
4352	MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene	0,65	-2,01
100128327	BET3L	BET3 like (S. cerevisiae)	4,48	-2,01
-	A_32_P177477	non-RefSeq gene	0,21	-2,01
-	AF085913	Homo sapiens full length insert cDNA clone YR04D03	2,35	-2,01
152137	CCDC50	coiled-coil domain containing 50	0,35	-2,02
-	A_32_P76602	non-RefSeq gene	0,82	-2,02
-	DA093175	DA093175 BRACE3 Homo sapiens cDNA clone BRACE3001863 5', mRNA sequence	0,53	-2,03
121512	FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	0,13	-2,03
-	BC034289	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4825100 [BC034289]	1,58	-2,03
-	A_23_P394562	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator [Source: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:Q92834] [ENST00000339363]	1,02	-2,03
-	A_32_P107441	non-RefSeq gene	1,71	-2,04
100131541	UNQ6228	hypothetical LOC100131541	1,95	-2,04
-	A_32_P159176	non-RefSeq gene	0,25	-2,04
158801	CXorf42	chromosome X open reading frame 42	0,25	-2,04
-	AK125129	Homo sapiens cDNA FLJ43139 fis, clone CTONG3007444	0,65	-2,05
27099	C7orf54	chromosome 7 open reading frame 54	0,18	-2,05
-	A_24_P940079	non-RefSeq gene	0,65	-2,06
-	A_32_P211048	non-RefSeq gene	3,96	-2,06
29065	DDEF1IT1	DDEF1 intronic transcript 1 (non-protein coding)	2,02	-2,07
-	A_24_P937965	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit (RAB3 GTPase-activating protein 130 kDa subunit)(Rab3-GAP p130)(Rab3-GAP) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q15042] [ENST00000425393]	0,25	-2,07
8924	HERC2	hect domain and RLD 2	4,48	-2,07
100128164	LOC100128164	four and a half LIM domains 1 pseudogene	1,02	-2,07

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
5788	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	0,99	-2,07
-	A_32_P225625	non-RefSeq gene	0,53	-2,08
-	A_32_P233834	non-RefSeq gene	2,02	-2,08
-	A_32_P130083	non-RefSeq gene	2,80	-2,08
-	AF009267	Homo sapiens clone FBA1 Cri-du-chat region mRNA	0,53	-2,08
-	A_24_P513669	non-RefSeq gene	3,60	-2,08
100133280	LOC100133280	similar to Putative POM121-like protein 1-like	3,80	-2,09
114898	C1QTNF2	C1q and tumor necrosis factor related protein 2	2,80	-2,09
-	AJ312027	Homo sapiens mRNA for hypothetical protein (C8ORF15)	2,80	-2,10
80790	CMIP	c-Maf-inducing protein	0,38	-2,10
-	A_32_P164573	non-RefSeq gene	0,61	-2,10
10973	ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	0,44	-2,10
65010	SLC26A6	solute carrier family 26, member 6	3,57	-2,10
1466	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2	2,87	-2,11
26052	DNM3	dynamamin 3	1,34	-2,11
55728	N4BP2	NEDD4 binding protein 2	0,25	-2,13
-	AF090926	Homo sapiens clone HQ0456 PRO0456 mRNA, complete cds	3,91	-2,13
7341	SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	3,57	-2,13
-	AK130741	Homo sapiens cDNA FLJ27231 fis, clone SYN06240	1,72	-2,13
-	A_32_P221641	non-RefSeq gene	0,64	-2,13
-	AF144054	Homo sapiens apoptosis related protein APR-4 mRNA, partial cds	3,80	-2,13
-	AK130644	Homo sapiens cDNA FLJ27134 fis, clone SPL08315	0,16	-2,13
-	CD655200	AGENCOURT_14538243 NIA Human H1 Embryonic Stem Cell cDNA Library (Long) Homo sapiens cDNA clone IMAGE:30423674 5', mRNA sequence	0,18	-2,14
641522	ARL17	ADP-ribosylation factor-like 17	3,96	-2,14
-	A_32_P138409	non-RefSeq gene	0,13	-2,14

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
-	A_32_P156171	non-RefSeq gene	0,65	-2,15
56971	CEACAM19	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 19	0,48	-2,15
-	A_32_P111266	non-RefSeq gene	0,11	-2,16
100131170	LOC100131170	hypothetical LOC100131170	1,71	-2,16
100132247	LOC100132247	similar to Uncharacterized protein KIAA0220	0	-2,16
-	AK094209	Sterile alpha motif domain-containing protein 14 [Source: UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8IZD0] [ENST00000285206]	3,25	-2,17
85439	STON2	stonin 2	1,48	-2,17
-	CR599788	full-length cDNA clone CS0DC013YA17 of Neuroblastoma Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	3,80	-2,17
6533	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	0	-2,17
-	AK096778	Homo sapiens cDNA FLJ39459 fis, clone PROST2011439	4,81	-2,17
-	A_32_P26721	non-RefSeq gene	1,71	-2,18
-	A_23_P425932	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A (Vesicle transport v-SNARE protein Vti1-like 2)(Vti1-rp2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:Q96AJ9] [ENST00000369399]	0,13	-2,18
5460	POU5F1	POU class 5 homeobox 1	0,21	-2,18
-	AK090477	Homo sapiens mRNA for FLJ00399 protein	0,21	-2,18
-	A_23_P83991	non-RefSeq gene	3,80	-2,19
-	A_24_P914649	non-RefSeq gene	0,13	-2,19
84953	MICALCL	MICAL C-terminal like	0,64	-2,20
-	A_32_P41099	non-RefSeq gene	0	-2,20
89765	RSPH1	radial spoke head 1 homolog (Chlamydomonas)	3,60	-2,20
8776	MTMR1	myotubularin related protein 1	1,02	-2,20
4774	NFIA	nuclear factor I/A	3,80	-2,20
57110	HRASLS	HRAS-like suppressor	4,48	-2,20

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
-	A_32_P78285	non-RefSeq gene	4,18	-2,21
-	A_23_P57393	non-RefSeq gene	0	-2,21
-	A_24_P662177	non-RefSeq gene	0,25	-2,21
-	AK097197	Homo sapiens cDNA FLJ39878 fis, clone SPLEN2016045	3,80	-2,22
23236	PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	0,11	-2,22
-	A_32_P225301	non-RefSeq gene	0,82	-2,22
-	CD239706	FNBPXF03 FNP Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	0,13	-2,23
-	AF116718	HCG1777198, isoform CRA_aPRO2900; [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:Q9P1C0] [ENST00000440008]	2,35	-2,23
7057	THBS1	thrombospondin 1	2,60	-2,23
-	A_32_P172453	non-RefSeq gene	0	-2,23
-	AL833696	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667D139 (from clone DKFZp667D139) [AL833696]	3,80	-2,23
100288671	LOC100288671	similar to hCG2006901	0,21	-2,23
-	A_32_P64263	non-RefSeq gene	4,48	-2,24
28560	TRBV27	T cell receptor beta variable 27	0,52	-2,25
3556	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	0,96	-2,25
94274	PPP1R14A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	0,74	-2,26
222159	LOC222159	hypothetical protein LOC222159	2,37	-2,27
-	A_23_P136013	non-RefSeq gene	0	-2,27
3690	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	2,12	-2,27
4026	LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	0,65	-2,28
-	A_24_P539226	non-RefSeq gene	3,25	-2,29
-	A_24_P870101	non-RefSeq gene	0,18	-2,29
-	AL134462	DKFZp547J085_r1 547 (synonym: hfbr1) Homo sapiens cDNA clone DKFZp547J085 5', mRNA sequence	0,18	-2,31
-	A_24_P595877	non-RefSeq gene	1,26	-2,31

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
100190986	LOC100190986	hypothetical LOC100190986	0,08	-2,31
151194	FAM119A	family with sequence similarity 119, member A	0,08	-2,32
-	AL832534	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547I2016 (from clone DKFZp547I2016)	0,16	-2,32
-	A_24_P213134	non-RefSeq gene	1,06	-2,32
-	A_24_P933548	non-RefSeq gene	1,48	-2,33
-	A_32_P109203	non-RefSeq gene	0,65	-2,34
-	A_32_P6972	non-RefSeq gene	3,60	-2,34
-	A_32_P118556	non-RefSeq gene	0,11	-2,35
-	A_24_P659980	non-RefSeq gene	0,11	-2,35
55353	LAPTM4B	lysosomal protein transmembrane 4 beta	4,48	-2,36
-	A_24_P491923	non-RefSeq gene	0	-2,38
-	AF086337	Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD58F06	0,28	-2,39
1994	ELAVL1	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	0,38	-2,39
10107	TRIM10	tripartite motif-containing 10	3,25	-2,40
-	A_32_P218823	non-RefSeq gene	1,34	-2,40
-	DA116424	DA116424 BRACE3 Homo sapiens cDNA clone BRACE3035779 5',mRNA sequence [DA116424]	0,52	-2,41
-	A_32_P99700	non-RefSeq gene	3,91	-2,41
-	AW972338	EST384429 MAGE resequenes, MAGL Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	0,11	-2,42
-	A_32_P12372	non-RefSeq gene	3,60	-2,42
4052	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	3,25	-2,42
246734	NPCDR1	nasopharyngeal carcinoma, down-regulated 1	1,02	-2,42
-	A_24_P932388	non-RefSeq gene	0,21	-2,43
-	A_32_P172545	non-RefSeq gene	0,21	-2,44

<b>Gene ID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
-	A_32_P196287	non-RefSeq gene	0,29	-2,44
7536	SF1	splicing factor 1	0,13	-2,44
257415	FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	0,57	-2,45
-	A_24_P42569	non-RefSeq gene	0,18	-2,46
1370	CPN2	carboxypeptidase N, polypeptide 2	0,16	-2,47
100134253	LOC100134253	hypothetical protein LOC100134253	2,35	-2,47
-	A_32_P4337	non-RefSeq gene	3,40	-2,47
-	A_23_P152570	non-RefSeq gene	2,33	-2,49
-	A_24_P917136	non-RefSeq gene	0	-2,49
-	A_24_P889473	non-RefSeq gene	1,20	-2,52
23049	SMG1	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)	0	-2,52
-	BF677084	602086629F1 NIH_MGC_83 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4250958 5',mRNA sequence	1,85	-2,54
800	CALD1	caldesmon 1	1,34	-2,54
55338	FLJ11292	hypothetical protein FLJ11292	0	-2,55
400509	RUNDC2B	RUN domain containing 2B	0,25	-2,55
55228	PNMAL1	PNMA-like 1	0,96	-2,55
-	A_24_P676566	non-RefSeq gene	2,39	-2,55
-	AW449271	UI-H-BI3-akh-e-01-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub5 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2734177 3', mRNA sequence	3,36	-2,55
-	A_32_P206561	non-RefSeq gene	0,44	-2,56
-	A_24_P713312	non-RefSeq gene	0,40	-2,57
2888	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	2,87	-2,57
-	AK129982	cDNA FLJ26472 fis, clone KDN04506 [Source:UniProtKB/TrEMBL; Acc:Q6ZP57] [ENST00000357132]	1,02	-2,57
-	A_32_P230537	non-RefSeq gene	1,02	-2,57

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
10658	CUGBP1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	1,20	-2,59
23468	CBX5	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)	0,53	-2,60
-	A_24_P930337	non-RefSeq gene	0	-2,61
-	A_32_P234661	non-RefSeq gene	0	-2,61
-	AK022346	Homo sapiens cDNA FLJ12284 fis, clone MAMMA1001757	0	-2,63
-	A_32_P62371	non-RefSeq gene	2,35	-2,63
112399	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)	0,87	-2,67
-	A_32_P157415	non-RefSeq gene	0,18	-2,68
-	DA240028	DA240028 BRAWH3 Homo sapiens cDNA clone BRAWH3037504 5', mRNA sequence	0,65	-2,69
-	CR749547	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686J17110 (from clone DKFZp686J17110)	1,26	-2,71
-	AL833452	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686E08116 (from clone DKFZp686E08116)	0	-2,74
-	A_32_P3342	non-RefSeq gene	0,61	-2,75
170591	S100Z	S100 calcium binding protein Z	0,29	-2,76
-	A_32_P169222	non-RefSeq gene	2,35	-2,76
-	A_24_P67552	Putative uncharacterized protein ENSP00000348067 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A6NGY4] [ENST00000355813]	0,16	-2,79
5087	PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	3,25	-2,79
-	AL080232	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586A061 (from clone DKFZp586A061)	0,13	-2,80
-	A_32_P40673	non-RefSeq gene	2,94	-2,80
-	A_32_P146844	non-RefSeq gene	0	-2,80
9839	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2	1,06	-2,82
-	A_32_P40145	non-RefSeq gene	1,34	-2,85
-	A_32_P120604	Sorting nexin-29 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:Q8TEQ0] [ENST00000219090]	0,25	-2,91

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>
-	BU726029	UI-E-CI0-aac-g-02-0-UI.s1 UI-E-CI0 Homo sapiens cDNA clone UI-E-CI0-aac-g-02-0-UI 3', mRNA sequence	0,13	-2,92
195814	SDR16C5	short chain dehydrogenase/reductase family 16C, member 5	2,87	-2,93
-	AL390214	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564O2423 (from clone DKFZp564O2423)	0,61	-2,93
-	A_24_P668572	non-RefSeq gene	0,16	-2,93
-	AK098043	Homo sapiens cDNA FLJ40724 fis, clone THYMU2028724	3,25	-2,94
-	A_32_P71171	non-RefSeq gene	0,18	-2,96
7145	TNS1	tensin 1	1,39	-2,96
-	BQ028202	UI-H-CO0-arj-d-09-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub9 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3106600 3', mRNA sequence	0,53	-2,99
5352	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	1,06	-3,00
-	BX106190	BX106190 Soares melanocyte 2NbHM Homo sapiens cDNA clone IMAGp998M21584, mRNA sequence	0	-3,01
-	AK022204	Homo sapiens cDNA FLJ12142 fis, clone MAMMA1000356	0	-3,06
-	BX100717	BX100717 NCI_CGAP_Lu24 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998I135799, mRNA sequence	4,18	-3,10
23036	ZNF292	zinc finger protein 292	0	-3,13
288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	0,53	-3,16
-	A_24_P356	AP2-associated protein kinase 1 (EC 2.7.11.1) (Adaptor-associated kinase 1) [Source: UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q2M2I8] [ENST00000406297]	1,02	-3,20
-	AK022268	Homo sapiens cDNA FLJ12206 fis, clone MAMMA1000941	0	-3,21
-	A_32_P152544	non-RefSeq gene	0	-3,26
-	A_32_P146826	non-RefSeq gene	0,38	-3,28
728640	LOC728640	family with sequence similarity 133, member B pseudogene	0,28	-3,29
-	A_24_P916853	non-RefSeq gene	0,28	-3,29

Gene ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	<i>q-value</i> <sup>*</sup>	<i>Fold Change</i> <sup>‡</sup>
-	A_24_P375592	non-RefSeq gene	0	-3,41
-	A_32_P187304	non-RefSeq gene	0	-3,45
-	BX114900	BX114900 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998L191010, mRNA sequence	0,25	-3,56
-	AK024937	Homo sapiens cDNA: FLJ21284 fis, clone COL01911	0,69	-3,57
-	A_32_P91743	non-RefSeq gene	0,24	-3,62
-	A_32_P192293	non-RefSeq gene	0,53	-3,65
731789	LOC731789	hypothetical LOC731789	0,64	-3,72
-	A_24_P914102	non-RefSeq gene	0,21	-3,73
-	A_32_P209582	non-RefSeq gene	0,16	-3,74
-	A_32_P134090	non-RefSeq gene	0	-3,88
-	A_32_P126688	non-RefSeq gene	0,28	-3,95
4635	MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic	2,37	-4,09
3397	ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	3,80	-4,29
-	A_24_P804216	non-RefSeq gene	0,38	-4,62

<sup>\*</sup> *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>‡</sup> *Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão do pós-tratamento em relação ao pré-tratamento dos não responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos em amostras pós-tratamento em relação às amostras pré-tratamento dos não responsivos.

**APÊNDICE 5.** Lista dos 83 lncRNAs diferencialmente expressos e exclusivos entre amostras pré-tratamento e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe.

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
55732	C1orf112	chromosome 1 open reading frame 112	AS-PIN	7,32	2,39
9159	PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	S-TIN	8,76	1,98
57018	CCNL1	cyclin L1	AS-PIN	4,24	1,94
3109	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	AS-PIN	7,32	1,85
3309	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	AS-PIN	6,71	1,83
151649	C3orf48	chromosome 3 open reading frame 48	AS-PIN	4,24	1,81
7905	REEP5	receptor accessory protein 5	AS-TIN	8,76	1,80
7629	ZNF76	zinc finger protein 76 (expressed in testis)	S-TIN	7,32	1,74
1982	EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	AS-PIN	1,94	1,69
6434	SFRS10	splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, Drosophila)	AS-PIN	5,44	1,69
9528	TMEM59	transmembrane protein 59	AS-PIN	2,28	1,69
752	FMNL1	formin-like 1	AS-PIN	7,32	1,64
54509	RHOF	ras homolog gene family, member F (in filopodia)	AS-PIN	8,36	1,64
2316	FLNA	filamin A, alpha (actin binding protein 280)	AS-PIN	1,69	1,62
972	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	AS-PIN	9,03	1,60
309	ANXA6	annexin A6	AS-PIN	7,32	1,59
64760	RAI16	retinoic acid induced 16	AS-PIN	7,32	1,59
3716	JAK1	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	AS-PIN	7,60	1,58
752	FMNL1	formin-like 1	AS-PIN	0	1,55
899	CCNF	cyclin F	AS-TIN	7,32	1,55
10163	WASF2	WAS protein family, member 2	S-TIN	6,71	1,55

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
55125	CEP192	centrosomal protein 192kDa	AS-PIN	7,32	1,55
10519	CIB1	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	AS-PIN	4,24	1,51
8603	C4orf8	chromosome 4 open reading frame 8	AS-TIN	8,15	-1,50
23185	LARP5	La ribonucleoprotein domain family, member 5	S-TIN	7,49	-1,52
22985	ACIN1	apoptotic chromatin condensation inducer 1	S-TIN	7,49	-1,55
8202	NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	AS-PIN	3,87	-1,57
9577	BRE	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	S-TIN	6,72	-1,57
57492	ARID1B	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	S-TIN	3,36	-1,58
11188	NISCH	nischarin	AS-PIN	5,50	-1,61
8452	CUL3	cullin 3	S-TIN	6,60	-1,63
116159	CYYR1	cysteine/tyrosine-rich 1	S-TIN	2,15	-1,65
55763	EXOC1	exocyst complex component 1	S-TIN	0	-1,68
60412	EXOC4	exocyst complex component 4	S-TIN	2,15	-1,71
60685	ZFAND3	zinc finger, AN1-type domain 3	S-TIN	2,15	-1,71
6421	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	AS-PIN	3,87	-1,72
1859	DYRK1A	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	S-TIN	2,15	-1,73
1806	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase	S-TIN	8,30	-1,74
5921	RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	S-TIN	7,49	-1,74
22834	ZNF652	zinc finger protein 652	S-TIN	2,15	-1,76
9261	MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	S-TIN	7,49	-1,79
29123	ANKRD11	ankyrin repeat domain 11	S-TIN	4,77	-1,80
23048	FNBP1	formin binding protein 1	AS-PIN	2,15	-1,82
25814	ATXN10	ataxin 10	S-TIN	0	-1,82
54828	BCAS3	breast carcinoma amplified sequence 3	S-TIN	2,15	-1,83
3899	AFF3	AF4/FMR2 family, member 3	S-TIN	2,15	-1,84

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
673	BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	S-TIN	2,15	-1,86
2131	EXT1	exostoses (multiple) 1	S-TIN	6,44	-1,86
124540	MSI2	musashi homolog 2 (Drosophila)	S-TIN	2,15	-1,86
29028	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	S-TIN	3,01	-1,90
23315	SLC9A8	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 8	S-TIN	0	-1,91
5795	PTPRJ	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J	S-TIN	7,49	-1,93
6599	SMARCC1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1	S-TIN	9,55	-1,96
22872	SEC31A	SEC31 homolog A (S. cerevisiae)	S-TIN	3,91	-1,98
152137	CCDC50	coiled-coil domain containing 50	AS-TIN	6,71	-1,99
84909	C9orf3	chromosome 9 open reading frame 3	S-TIN	3,76	-2,00
123169	LEO1	Leo1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	AS-TIN	2,15	-2,00
205564	SENP5	SUMO1/sentrin specific peptidase 5	S-TIN	3,87	-2,00
80790	CMIP	c-Maf-inducing protein	S-TIN	2,15	-2,01
4802	NFYC	nuclear transcription factor Y, gamma	S-TIN	3,01	-2,02
64374	SIL1	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum chaperone (S. cerevisiae)	S-TIN	0	-2,04
55500	ETNK1	ethanolamine kinase 1	S-TIN	3,01	-2,09
27246	ZNF364	zinc finger protein 364	S-TIN	2,15	-2,10
7038	TG	thyroglobulin	AS-TIN	3,01	-2,18
25771	TBC1D22A	TBC1 domain family, member 22A	S-TIN	0	-2,19
9267	PSCD1	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1 (cytohesin 1)	S-TIN	5,92	-2,24
23387	KIAA0999	KIAA0999 protein	S-TIN	5,82	-2,26
84498	FAM120B	family with sequence similarity 120B	S-TIN	5,92	-2,32
8301	PICALM	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	S-TIN	3,36	-2,35
4299	AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	S-TIN	4,60	-2,40

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold Change<sup>§</sup></b>
23473	CAPN7	calpain 7	AS-TIN	6,72	-2,45
51366	EDD1	E3 ubiquitin protein ligase, HECT domain containing, 1	S-TIN	5,82	-2,46
3708	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	S-TIN	2,15	-2,52
960	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	S-TIN	9,55	-2,71
83696	NIBP	NIK and IKK{beta} binding protein	S-TIN	0	-2,74
8202	NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	S-TIN	2,15	-2,77
5768	QSCN6	quiescin Q6	S-TIN	3,01	-2,81
50488	MINK1	misshapen-like kinase 1 (zebrafish)	S-TIN	4,60	-2,86
201595	STT3B	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (S. cerevisiae)	S-TIN	0	-2,91
7534	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	AS-TIN	2,15	-2,99
5090	PBX3	pre-B-cell leukemia transcription factor 3	S-TIN	4,60	-3,06
57492	ARID1B	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	S-TIN	2,15	-3,22
10735	STAG2	stromal antigen 2	S-TIN	0	-3,50

\*Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-TIN, lncRNA totalmente intrônico antisense; AS-PIN, lncRNA parcialmente intrônico antisense. <sup>‡</sup>q-value representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>§</sup>Fold Change é calculado como a razão da média dos valores de expressão do pós-tratamento em relação ao pré-tratamento dos não responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hipereexpressos e hipoexpressos em amostras pós-tratamento em relação às amostras pré-tratamento dos não responsivos.

**APÊNDICE 6.** Lista dos 11 genes diferencialmente expressos identificados exclusivamente em comum entre o subgrupo 1 (amostras pré-tratamento de responsivos e pré-tratamento de não responsivos) e o subgrupo 2 (amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos).

ID gene	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡	q-value*	Fold Change‡
			Pré-R versus Pré-NR	Pré-R versus Pré-NR	Pré-R versus Pós-NR	Pré-R versus Pós-NR
	CR608961	full-length cDNA clone CS0DI034YJ14 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	1,56	2,26	1,92	2,37
54762	GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	1,76	-2,96	0,22	-2,64
169200	TMEM64	transmembrane protein 64	1,29	-2,54	0	-2,89
55024	BANK1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	1,48	-2,93	0,04	-3,01
3543	IgLL1	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	1,64	-2,79	0	-3,20
100293440	LOC100293440	similar to Ig lambda chain	2,20	-2,83	0	-3,56
	AJ319669	Homo sapiens germline mRNA for immunoglobulin lambda-2 chain constant region, Daudi cell line	3,99	-2,56	0	-3,62
8832	CD84	CD84 molecule	0	-2,18	0	-4,07
5074	PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	0	-2,46	0	-4,19
10643	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	1,29	-2,23	0	-4,95
	AF289562	Homo sapiens clone pp6337 unknown mRNA	1,48	-2,98	0,22	-5,54

\* *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). ‡ *Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

**APÊNDICE 7.** Lista dos três lncRNAs identificados em comum entre o subgrupo 1 (amostras pré-tratamento de responsivos e pré-tratamento de não responsivos) e o subgrupo 2 (amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos).

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>Tipo de Probe*</b>	<b>q-value<sup>‡</sup> Pré-R versus Pré-NR</b>	<b>Fold Change<sup>§</sup> Pré-R versus Pré-NR</b>	<b>q-value<sup>‡</sup> Pré-R versus Pós-NR</b>	<b>Fold Change<sup>§</sup> Pré-R versus Pós-NR</b>
<b>1112</b>	CHES1	checkpoint suppressor 1	S-TIN	7,45	-1,57	0	-1,75
<b>5579</b>	PRKCB1	protein kinase C, beta 1	AS-TIN	7,45	-1,88	3,44	-2,06
<b>6051</b>	RNPEP	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase	S-TIN	5,41	-1,60	0,93	-1,72

B)

\*Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-TIN, lncRNA totalmente intrônico antisenso. <sup>‡</sup>*q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>§</sup>*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

**APÊNDICE 8.** Lista dos 76 genes diferencialmente expressos identificados em comum entre o subgrupo 2 (amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos) e o subgrupo 3 (amostras pré-tratamento e pós-tratamento de não responsivos).

ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>	q-value*	Fold Change <sup>§</sup>
			Pré-R versus Pós-NR	Pré-R versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR
7172	TPMT	thiopurine S-methyltransferase	3,42	3,14	1,58	2,26
53840	TRIM34	tripartite motif-containing 34	0,20	2,46	0	2,09
305	ANXA2P3	annexin A2 pseudogene 3	3,42	2,42	1,58	2,03
9600	PITPNM1	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1	1,16	2,09	0,12	2,00
1191	CLU	clusterin	0,22	-4,47	2,02	-2,00
64423	INF2	inverted formin, FH2 and WH2 domain containing	0,57	-2,06	0,52	-2,00
81579	PLA2G12A	phospholipase A2, group XIIA	0	-2,51	2,35	-2,02
7148	TNXB	tenascin XB	0,46	-4,00	0,16	-2,02
116173	CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	0,68	-4,22	2,87	-2,02
51471	NAT8B	N-acetyltransferase 8B (GCN5-related, putative, gene/pseudogene)	2,71	-3,11	1,71	-2,04
6710	SPTB	spectrin, beta, erythrocytic	3,42	-5,52	2,37	-2,05
3875	KRT18	keratin 18	0,45	-2,48	0	-2,05
2983	GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	2,71	-4,43	3,25	-2,05
	BX090390	BX090390 Soares fetal liver spleen 1NFLS Homo sapiens cDNA clone IMAGp998I10652; IMAGE:292689, mRNA sequence [BX090390]	1,64	-2,18	0,44	-2,05
5196	PF4	platelet factor 4	0,37	-4,49	0,55	-2,06

ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>	q-value*	Fold Change <sup>§</sup>
			Pré-R versus Pós-NR	Pré-R versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR
353144	LCE3C	late cornified envelope 3C	0,62	-2,40	4,56	-2,07
5413	SEPT5	septin 5	0	-3,27	0,96	-2,07
9848	MFAP3L	microfibrillar-associated protein 3-like	1,34	-3,30	0,35	-2,09
10217	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	1,31	-4,13	2,87	-2,09
8853	ASAP2	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2	0,68	-4,04	0,40	-2,09
80739	C6orf25	chromosome 6 open reading frame 25	0,37	-3,21	3,91	-2,10
5874	RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	1,34	-3,91	3,25	-2,14
171558	PTCRA	pre T-cell antigen receptor alpha	0	-2,59	2,02	-2,14
6547	SLC8A3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	1,64	-2,58	4,48	-2,15
	AK024956	Homo sapiens cDNA: FLJ21303 fis, clone COL02107 [AK024956]	0	-2,58	0,18	-2,17
5577	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	0	-5,65	0,52	-2,18
94121	SYTL4	synaptotagmin-like 4	3,42	-4,72	0,16	-2,20
2982	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	0,62	-2,37	0,74	-2,22
51807	TUBA8	tubulin, alpha 8	0,22	-4,01	0,21	-2,22
27018	NGFRAP1	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	1,01	-2,36	0,96	-2,22
56952	PRTFDC1	phosphoribosyl transferase domain containing 1	2,74	-5,77	2,94	-2,23
221037	JMJD1C	jumonji domain containing 1C	1,31	-2,47	0,21	-2,23
7292	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	0,04	-3,57	2,90	-2,24

ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>	q-value*	Fold Change <sup>§</sup>
			Pré-R versus Pós-NR	Pré-R versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR
51312	SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	1,54	-2,39	0,18	-2,24
1668	DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	2,74	-2,37	1,20	-2,26
2781	GNAZ	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide	0	-6,42	0	-2,26
7122	CLDN5	claudin 5	0,34	-4,21	0,85	-2,27
	A_24_P918830	non-RefSeq gene	2,31	-2,15	0,44	-2,27
55287	TMEM40	transmembrane protein 40	1,74	-3,25	0,35	-2,28
	ENST00000437044	Trem-like transcript 1 protein Precursor (TLT-1)(Triggering receptor expressed on myeloid cells-like protein 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot; Acc:Q86YW5] [ENST00000437044]	0	-4,45	2,33	-2,28
6915	TBXA2R	thromboxane A2 receptor	0	-3,37	1,71	-2,28
81027	TUBB1	tubulin, beta 1	0,23	-3,89	0,24	-2,32
6532	SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	0,77	-2,83	2,15	-2,33
9911	TMCC2	transmembrane and coiled-coil domain family 2	2,74	-2,38	0,25	-2,33
	A_32_P114020	non-RefSeq gene	0	-3,47	1,34	-2,33
5742	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	1,64	-3,30	2,33	-2,39
6886	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	1,08	-4,20	0,25	-2,40
440917	LOC440917	similar to 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) (Mitochondrial import stimulation factor L subunit) (MSF L)	0,37	-2,11	0,44	-2,41
84281	C2orf88	chromosome 2 open reading frame 88	0,22	-4,21	1,60	-2,42

ID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>	q-value*	Fold Change <sup>§</sup>
			Pré-R versus Pós-NR	Pré-R versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR
4638	MYLK	myosin light chain kinase	0	-5,66	0,62	-2,42
4211	MEIS1	Meis homeobox 1	3,72	-4,35	0,16	-2,43
9886	RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	2,31	-4,01	0	-2,44
83699	SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	0,91	-4,86	0,28	-2,47
8714	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	0	-4,71	0,18	-2,48
9628	RGS6	regulator of G-protein signaling 6	0	-4,10	1,06	-2,50
3690	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	2,17	-3,90	0,63	-2,51
654	BMP6	bone morphogenetic protein 6	0,46	-2,52	1,06	-2,60
5627	PROS1	protein S (alpha)	1,90	-4,85	3,52	-2,60
100130938	LOC100130938	hypothetical LOC100130938	2,31	-3,23	0,52	-2,61
6403	SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	2,74	-4,28	0,74	-2,64
2791	GNG11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	0	-5,46	3,57	-2,67
8436	SDPR	serum deprivation response	0	-6,39	0,35	-2,69
79993	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0	-4,30	1,26	-2,70
85439	STON2	stonin 2	0	-2,96	0	-2,70
2811	GP1BA	glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide	2,74	-5,85	0	-2,74
286	ANK1	ankyrin 1, erythrocytic	3,08	-2,76	2,94	-2,78
	A_32_P94176	non-RefSeq gene	0,22	-2,71	0,28	-2,85
6678	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	0	-3,15	0,74	-2,86
395	ARHGAP6	Rho GTPase activating protein 6	0,23	-5,65	2,87	-2,90

ID gene	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change <sup>‡</sup>	q-value*	Fold Change <sup>§</sup>
			Pré-R versus Pós-NR	Pré-R versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR	Pré-NR versus Pós-NR
	A_32_P132936	non-RefSeq gene	0,46	-3,27	0,82	-3,05
9717	SEC14L5	SEC14-like 5 (S. cerevisiae)	0	-4,74	0,43	-3,19
	A_32_P106466	non-RefSeq gene	2,71	-2,28	3,57	-3,31
5154	PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	0	-6,72	0,52	-3,38
	ENST00000414055	Transmembrane protein 16M. Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q5TEV4] [ENST00000414055]	0,88	-2,61	2,02	-3,47
	A_24_P924521	non-RefSeq gene	0,46	-3,47	2,80	-4,18
5473	PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	0	-6,77	0,38	-2,59

\* *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>‡</sup>*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. <sup>§</sup>*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão do pós-tratamento em relação ao pré-tratamento dos não responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos ou nas amostras pós-dasatinibe em relação às amostras pré-dasatinibe dos não responsivos. ||comum aos três subgrupos de comparação.

**APÊNDICE 9.** Lista dos 13 lncRNAs identificados em comum entre o subgrupo 2 (amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos) e o subgrupo 3 (amostras pré-tratamento e pós-tratamento de não responsivos).

<b>ID</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Descrição do</b>	<b>Tipo de</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold</b>	<b>q-value<sup>‡</sup></b>	<b>Fold</b>
<b>gene</b>	<b>do</b>	<b>gene</b>	<b>Probe*</b>	<b>Pré-R</b>	<b>Change<sup>§</sup></b>	<b>Pré-NR</b>	<b>Change<sup>l</sup></b>
<b>hospedeiro</b>	<b>gene</b>	<b>hospedeiro</b>		<b>versus</b>	<b>Pré-R</b>	<b>versus</b>	<b>Pré-NR</b>
	<b>hospedeiro</b>			<b>Pós-NR</b>	<b>versus</b>	<b>Pós-NR</b>	<b>versus</b>
					<b>Pós-NR</b>		<b>Pós-NR</b>
3133	HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E	AS-PIN	6,85	1,54	0	1,79
153830	FLJ31951	hypothetical protein FLJ31951	S-TIN	3,15	1,74	6,71	1,68
25972	UNC50	unc-50 homolog (C. elegans)	AS-PIN	5,03	2,16	4,24	1,61
2984	GUCY2C	guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)	S-TIN	5,22	1,96	6,71	1,54
1520	CTSS	cathepsin S	AS-PIN	9,54	1,84	8,39	1,51
10487	CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	AS-PIN	5,22	1,62	7,32	1,51
3455	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	S-TIN	8,42	-1,88	3,01	-1,73
84441	MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	S-TIN	8,42	-3,13	6,72	-1,92
51741	WWOX	WW domain containing oxidoreductase	S-TIN	3,44	-2,91	1,77	-1,97
9516	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor	S-TIN	1,31	-1,74	4,60	-1,99
463	ATBF1	AT-binding transcription factor 1	AS-PIN	9,54	-1,55	2,15	-2,06
4628	MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle	AS-PIN	5,09	-2,50	3,01	-2,11
9101	USP8	ubiquitin specific peptidase 8	S-TIN	3,44	-1,99	4,80	-2,47

\*Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-PIN, lncRNA parcialmente intrônico antisense. <sup>‡</sup>q-value representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). <sup>§</sup>Fold Change é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não

responsivos em relação aos responsivos. <sup>1</sup>*Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão do pós-tratamento em relação ao pré-tratamento dos não responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos ou nas amostras pós-dasatinibe em relação às amostras pré-dasatinibe dos não responsivos.

**APÊNDICE 10.** Lista dos 797 genes codificadores de proteína diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM.

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
8115	TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A	0,51	6,19
10290	SPEG	SPEG complex locus	1,15	5,79
-	A_24_P161317	non-RefSeq gene	0	5,76
-	A_24_P127543	non-RefSeq gene	0	5,67
259197	NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	0	5,64
54674	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	1,33	5,45
5197	PF4V1	platelet factor 4 variant 1	0,44	5,41
-	THC2300570	non-RefSeq gene	0,91	5,35
64788	LMF1	lipase maturation factor 1	0,34	5,20
202134	FAM153B	family with sequence similarity 153, member B	3,46	5,19
-	A_24_P101211	non-RefSeq gene	0	5,18
-	CR749547	cDNA DKFZp686J17110 (from clone DKFZp686J17110)	1,15	5,18
-	A_24_P698816	non-RefSeq gene	0	5,03
51176	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	0,44	4,93
55022	PID1	phosphotyrosine interaction domain containing 1	0,51	4,83
11167	FSTL1	follistatin-like 1	2,00	4,83
-	A_23_P125016	non-RefSeq gene	0	4,79
26289	AK5	adenylate kinase 5	0,22	4,76
2791	GNG11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	4,72	4,73
8968	HIST1H3F	histone cluster 1, H3f	1,33	4,67
-	A_24_P332461	non-RefSeq gene	0,22	4,64
-	THC2397697	non-RefSeq gene	0,51	4,64
1236	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	0,44	4,63

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
-	X86121	H.sapiens mRNA for T cell receptor, V beta 1, J beta 2.7, C beta 2	2,83	4,63
-	A_24_P76362	non-RefSeq gene	0	4,61
-	A_24_P41662	non-RefSeq gene	0	4,58
926	CD8B	CD8b molecule	0,22	4,57
3084	NRG1	neuregulin 1	4,72	4,52
-	A_24_P631625	non-RefSeq gene	0	4,50
-	A_24_P256073	non-RefSeq gene	0	4,49
-	A_24_P631948	non-RefSeq gene	0	4,42
926	CD8B	CD8b molecule	0,22	4,37
-	BC035091	cDNA clone IMAGE:5261717	0	4,35
-	A_24_P843552	non-RefSeq gene	0	4,35
114804	RNF157	ring finger protein 157	0,72	4,31
-	ENST00000356104	non-RefSeq gene	0	4,30
7941	PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	0,51	4,29
817	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	0	4,27
-	A_24_P333052	non-RefSeq gene	0	4,25
4753	NELL2	NEL-like 2 (chicken)	1,15	4,25
2556	GABRA3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3	0,22	4,23
-	A_32_P172198	non-RefSeq gene	0	4,22
9332	CD163	CD163 molecule	0,91	4,21
9737	GPRASP1	G protein-coupled receptor associated sorting protein 1	0,51	4,21
11278	KLF12	Kruppel-like factor 12	0,72	4,21
6095	RORA	RAR-related orphan receptor A	1,33	4,20
-	LOC402251	PREDICTED: Homo sapiens similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (LOC402251)	0	4,19
6920	TCEA3	transcription elongation factor A (SII), 3	0,48	4,18

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
-	THC2309461	non-RefSeq gene	0,57	4,17
817	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	0,91	4,14
-	A_24_P50707	non-RefSeq gene	0	4,10
3214	HOXB4	homeobox B4	0	4,09
5450	POU2AF1	POU class 2 associating factor 1	0,91	4,09
3575	IL7R	interleukin 7 receptor	0,91	4,05
6932	TCF7	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	0,49	4,04
931	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	1,33	4,04
283663	LOC283663	hypothetical LOC283663	0,57	4,02
-	AX775927	Sequence 197 from Patent WO03048202	1,33	3,99
-	A_24_P717462	non-RefSeq gene	0	3,99
-	A_24_P392947	non-RefSeq gene	0	3,98
2012	EMP1	epithelial membrane protein 1	0,91	3,97
930	CD19	CD19 molecule	0,91	3,97
-	A_24_P25063	non-RefSeq gene	0	3,95
199786	FAM129C	family with sequence similarity 129, member C	1,17	3,94
-	A_24_P229807	non-RefSeq gene	0,22	3,94
-	A_24_P237820	non-RefSeq gene	0	3,94
-	A_24_P127661	non-RefSeq gene	0,57	3,93
-	A_24_P392622	non-RefSeq gene	0	3,92
27065	D4S234E	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence	2,00	3,90
8313	AXIN2	axin 2	1,68	3,89
-	LOC442227	PREDICTED: Homo sapiens similar to eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 (LOC442227)	0,22	3,87
57602	USP36	ubiquitin specific peptidase 36	0	3,87
687	KLF9	Kruppel-like factor 9	1,15	3,86

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
925	CD8A	CD8a molecule	0,91	3,86
-	A_24_P409910	non-RefSeq gene	0,22	3,84
140807	KRT72	keratin 72	0,34	3,83
-	ENST00000311232	non-RefSeq gene	0	3,81
8821	INPP4B	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	1,02	3,80
-	A_24_P106166	non-RefSeq gene	1,02	3,80
-	A_24_P807445	non-RefSeq gene	0	3,79
-	ENST00000358916	Sequence 224 from Patent WO0220754	0,22	3,79
64919	BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	1,15	3,79
3820	KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	1,15	3,78
54843	SYTL2	synaptotagmin-like 2	1,68	3,78
246734	NPCDR1	nasopharyngeal carcinoma, down-regulated 1	0,72	3,78
640	BLK	B lymphoid tyrosine kinase	0,91	3,78
-	A_24_P754989	non-RefSeq gene	0,22	3,77
283551	C14orf182	chromosome 14 open reading frame 182	0,72	3,77
114907	FBXO32	F-box protein 32	0,91	3,75
124602	KIF19	kinesin family member 19	2,00	3,74
8722	CTSF	cathepsin F	0,34	3,72
-	THC2311764	non-RefSeq gene	2,39	3,72
84824	FCRLA	Fc receptor-like A	2,39	3,71
100507307	LOC100507307	hypothetical LOC100507307	2,00	3,70
-	A_24_P392900	non-RefSeq gene	0	3,69
114907	FBXO32	F-box protein 32	2,00	3,69
399665	FAM102A	family with sequence similarity 102, member A	0,91	3,68
-	THC2403712	aspartate aminotransferase {Xylella fastidiosa Temecula1;} , partial (4%)	0,72	3,68
5654	HTRA1	HtrA serine peptidase 1	2,00	3,68

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
8718	TNFRSF25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	1,15	3,66
-	THC2280735	non-RefSeq gene	1,15	3,64
-	ENST00000308118	non-RefSeq gene	0	3,64
-	A_24_P170186	non-RefSeq gene	0	3,64
-	A_24_P178154	non-RefSeq gene	0,34	3,62
50649	ARHGEF4	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	2,00	3,61
2053	EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	1,68	3,59
-	ENST00000304016	non-RefSeq gene	0	3,58
-	A_24_P101661	non-RefSeq gene	0,51	3,56
129293	C2orf89	chromosome 2 open reading frame 89	1,36	3,55
-	ENST00000309901	non-RefSeq gene	0,34	3,55
-	A_24_P521662	non-RefSeq gene	0	3,54
-	A_24_P383802	non-RefSeq gene	0,44	3,54
79368	FCRL2	Fc receptor-like 2	1,68	3,54
7294	TXK	TXK tyrosine kinase	1,15	3,51
-	A_32_P214860	non-RefSeq gene	1,15	3,51
83891	SNX25	sorting nexin 25	1,33	3,50
-	L04336	(cell line: s6BG8) Ig rearranged H-chain mRNA V-region	2,00	3,50
-	ENST00000306634	similar to ribosomal protein L36 (LOC643205)	0,51	3,49
-	TRBV5-4	T cell receptor beta variable 5-4, mRNA (cDNA clone MGC:40031 IMAGE:5217067)	1,15	3,48
-	A_32_P180185	non-RefSeq gene	1,15	3,46
-	A_24_P366768	non-RefSeq gene	0	3,46
-	A_24_P264549	non-RefSeq gene	0	3,45
917	CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)	2,39	3,45
-	AK054895	cDNA FLJ30333 fis	1,02	3,45
80714	PBX4	pre-B-cell leukemia homeobox 4	2,00	3,45

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
974	CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta	0,72	3,44
-	A_32_P725839	non-RefSeq gene	0	3,44
59338	PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1	1,15	3,43
9397	NMT2	N-myristoyltransferase 2	1,33	3,43
-	A_24_P367399	non-RefSeq gene	0	3,43
933	CD22	CD22 molecule	2,00	3,43
9975	NR1D2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	1,33	3,43
-	THC2282321	AF235005 suppression of tumorigenicity 16 protein {Homo sapiens;} , partial (13%)	1,15	3,42
-	A_24_P161173	non-RefSeq gene	0	3,42
10417	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	1,68	3,41
-	A_24_P24786	non-RefSeq gene	0	3,41
-	X12544	Human mRNA for HLA class II DR-beta (HLA-DR B)	0,57	3,40
-	A_24_P289043	non-RefSeq gene	1,33	3,40
60468	BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	0,91	3,40
-	LOC652159	PREDICTED: Homo sapiens similar to Ig heavy chain V-III region VH26 precursor (LOC652159)	4,07	3,39
79652	TMEM204	transmembrane protein 204	3,46	3,39
152137	CCDC50	coiled-coil domain containing 50	2,04	3,39
56172	ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse)	1,33	3,39
-	A_24_P409560	non-RefSeq gene	0	3,39
-	A_23_P113811	<i>non-RefSeq gene</i>	0	3,38
340542	BEX5	brain expressed, X-linked 5	1,68	3,38
4054	LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	0,51	3,37
305	ANXA2P3	annexin A2 pseudogene 3	0,72	3,36
84159	ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	1,03	3,36

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
79710	MORC4	MORC family CW-type zinc finger 4	4,07	3,35
8911	CACNA1I	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1I subunit	2,00	3,34
23531	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	4,72	3,33
-	M14087	Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2	0	3,33
3755	KCNG1	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	2,83	3,33
57571	CARNS1	carnosine synthase 1	3,46	3,33
100132341	KIAA0664L3	KIAA0664-like 3	2,83	3,33
23136	EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	1,68	3,32
	A_24_P477048	non-RefSeq gene	0	3,32
91523	FAM113B	family with sequence similarity 113, member B	1,68	3,32
-	BX118285	cDNA clone IMAGp998G173521	0,34	3,31
4118	MAL	mal, T-cell differentiation protein	2,83	3,31
	BE926212	cDNA, mRNA sequence [BE926212]	0,22	3,31
51298	THEG	Theg homolog (mouse)	1,33	3,31
-	EVL	cDNA DKFZp586G1721 (from clone DKFZp586G1721)	0,51	3,31
-	CR621698	cDNA clone CS0DF030YF21 of Fetal brain	1,33	3,31
113791	PIK3IP1	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	1,42	3,30
971	CD72	CD72 molecule	3,46	3,30
940	CD28	CD28 molecule	2,83	3,30
3126	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	1,15	3,29
288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	2,92	3,28
100289410	MCF2L-AS1	MCF2L antisense RNA 1 (non-protein coding)	2,83	3,28
26049	FAM169A	family with sequence similarity 169, member A	2,39	3,28
-	BX096603	cDNA clone IMAGp998H151782	4,72	3,27
10462	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A	2,00	3,26
-	AF339771	clone IMAGE:1257951	4,07	3,26

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change‡</b>
8685	MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	1,68	3,26
83888	FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	4,07	3,25
10223	GPA33	glycoprotein A33 (transmembrane)	0,51	3,25
115584	SLC5A11	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	2,39	3,24
3932	LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	2,04	3,24
24145	PANX1	pannexin 1	1,68	3,24
51754	TMEM8B	transmembrane protein 8B	0,72	3,24
7125	TNNC2	troponin C type 2 (fast)	3,46	3,24
-	THC2406532	non-RefSeq gene	0,91	3,23
-	ENST00000309874	cDNA FLJ33063 fis	2,83	3,23
814	CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	1,15	3,23
-	AW340352	cDNA clone IMAGE:2908478 3' similar to TR:P70413 P70413 CYCLIN D-INTERACTING MYB-LIKE PROTEIN.	1,15	3,20
4261	CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator	1,41	3,19
-	A_24_P341078	non-RefSeq gene	0	3,19
81786	TRIM7	tripartite motif containing 7	1,68	3,18
100292427	LOC100292427	hypothetical protein LOC100292427	2,00	3,18
914	CD2	CD2 molecule	2,83	3,17
	A_24_P41781	non-RefSeq gene	0	3,16
146330	FBXL16	F-box and leucine-rich repeat protein 16	3,46	3,16
	A_24_P33385	non-RefSeq gene	0	3,16
9751	SNPH	syntaphilin	3,46	3,16
939	CD27	CD27 molecule	1,15	3,15
-	AF035020	clone B2E9D5H myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds. [AF035020]	2,83	3,15
-	ENST00000333546	PREDICTED: Homo sapiens similar to 60S ribosomal protein L23a (LOC391282)	0	3,15

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
-	AV739664	cDNA clone CBNAWB09 5'	1,02	3,15
-	AW589254	cDNA clone IMAGE:2921529 3' similar to contains Alu repetitive element;contains element MER11 repetitive element	0,44	3,15
-	A_24_P272735	non-RefSeq gene	0	3,14
-	A_24_P298616	non-RefSeq gene	0	3,13
54847	SIDT1	SID1 transmembrane family, member 1	2,39	3,13
84886	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	3,46	3,13
-	A_24_P118382	non-RefSeq gene	0	3,12
-	LOC644241	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC644240, transcript variant 1 (LOC644241)	1,33	3,12
83416	FCRL5	Fc receptor-like 5	4,72	3,12
-	ENST00000283694	Immunoglobulin variable region germ-line transcripts	2,83	3,12
3495	IGHD	immunoglobulin heavy constant delta	3,46	3,11
-	A_24_P366465	non-RefSeq gene	1,68	3,11
-	A_24_P273074	non-RefSeq gene	0	3,11
6095	RORA	RAR-related orphan receptor A	4,07	3,11
-	ENST00000305319	similar to 40S ribosomal protein S17	0	3,11
915	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	3,46	3,11
8631	SCAP1	src kinase associated phosphoprotein 1	3,46	3,11
-	THC2442515	non-RefSeq gene	4,72	3,10
203286	ANKS6	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6	0,72	3,10
11145	PLA2G16	phospholipase A2, group XVI	3,46	3,10
-	A_24_P161914	non-RefSeq gene	0	3,10
23348	DOCK9	dedicator of cytokinesis 9	4,07	3,10
2852	GPER	G protein-coupled estrogen receptor 1	0,91	3,09
347902	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	3,46	3,08
27033	ZBTB32	zinc finger and BTB domain containing 32	2,83	3,08

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
-	TRA@	T cell receptor alpha locus, mRNA (cDNA clone MGC:71411 IMAGE:4853814)	1,68	3,07
56995	TULP4	tubby like protein 4	1,33	3,07
501384.3333	LOC388152,LOC727849	golgin A2 pseudogene,hypothetical LOC388152	1,85	3,07
80162	ATHL1	ATH1, acid trehalase-like 1 (yeast)	1,15	3,07
7089	TLE2	transducin-like enhancer of split 2 (E(sp1) homolog, Drosophila)	2,83	3,06
933	CD22	CD22 molecule	3,46	3,06
160622	GRASP	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	4,07	3,06
100132941	LOC100132941	hypothetical protein LOC100132941	4,07	3,05
79814	AGMAT	agmatine ureohydrolase (agmatinase)	1,02	3,05
9572	NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	0,83	3,04
338440	ANO9	anoctamin 9	0,51	3,04
8110	DPF3	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	1,33	3,04
3001	GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	3,46	3,03
-	THC2275974	EF1B_HUMAN (P24534) Elongation factor 1-beta (EF-1-beta), complete	0,34	3,03
-		clone MC56H myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region mRNA	3,76	3,02
-	BG695979	cDNA clone IMAGE:4800772	1,15	3,02
56969	RPL23AP13	ribosomal protein L23a pseudogene 32	0	3,02
-	ENST00000360102	PREDICTED: Homo sapiens similar to Ig heavy chain V-III region VH26 precursor (LOC390714)	1,68	3,02
-	A_24_P418536	non-RefSeq gene	0,22	3,02
-	A_24_P289573	non-RefSeq gene	0	3,02
333926	PPM1J	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1J	1,68	3,02
162394	SLFN5	schlafen family member 5	4,07	3,02
7045	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	2,39	3,01

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
203429	NCRNA00246A	non-protein coding RNA 246A	3,46	3,01
-	A_23_P21393	non-RefSeq gene	2,83	3,00
-	ENST00000332804	full-length cDNA clone CS0DI026YJ08 of Placenta Cot 25-normalized	0	3,00
-	A_24_P273284	non-RefSeq gene	0,72	3,00
10859	LILRB1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	3,46	2,99
1291	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	0,44	2,99
-	S80931	V beta 5.5/J beta 2.7=anti-GRP peptide antigen T cell receptor beta chain { third hypervariable region } [human, stimulated synovial fluid T cells, DR8+ positive juvenile rheumatoid arthritis patient	2,83	2,99
11123	RCAN3	RCAN family member 3	0,91	2,98
29993	PACSIN1	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	2,18	2,98
	A_24_P144666	non-RefSeq gene	0	2,98
1601	DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	3,46	2,98
257240	KLHL34	kelch-like 34 (Drosophila)	1,15	2,98
340152	ZC3H12D	zinc finger CCCH-type containing 12D	3,46	2,98
-	ENST00000361266	non-RefSeq gene	3,46	2,97
-	A_24_P298604	non-RefSeq gene	0	2,97
7535	ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	2,07	2,97
-	THC2406165	non-RefSeq gene	0,72	2,96
-	A_24_P230388	non-RefSeq gene	0	2,96
-	A_24_P144054	non-RefSeq gene	0,22	2,96
-	THC2266506	RS24_HUMAN (P62847) 40S ribosomal protein S24	1,02	2,96
-	A_24_P556030	non-RefSeq gene	0,22	2,96
-	THC2266610	BC007276 HSPA8 protein {Homo sapiens;} , partial (17%)	0,44	2,95

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
6285	S100B	S100 calcium binding protein B	2,00	2,95
23308	ICOSLG	inducible T-cell co-stimulator ligand	1,02	2,94
-	A_24_P144254	non-RefSeq gene	0,72	2,93
79368	FCRL2	Fc receptor-like 2	1,33	2,93
274	BIN1	bridging integrator 1	1,09	2,93
11279	KLF8	Kruppel-like factor 8	2,83	2,92
147699	PPM1N	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1N (putative)	1,02	2,92
-	LOC137107	PREDICTED: Homo sapiens similar to ribosomal protein L10a (LOC137107)	0	2,92
94039	ZNF101	zinc finger protein 101	0	2,92
3702	ITK	IL2-inducible T-cell kinase	4,72	2,92
	THC2281660	non-RefSeq gene	2,00	2,92
51121	RPL26L1	ribosomal protein L26-like 1	0	2,92
23338	PHF15	PHD finger protein 15	0,57	2,91
-	A_24_P635355	non-RefSeq gene	0	2,91
283989	TSEN54	tRNA splicing endonuclease 54 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,33	2,91
5187	PER1	period homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	1,68	2,91
57698	KIAA1598	KIAA1598	4,07	2,90
57124	CD248	CD248 molecule, endosialin	3,46	2,90
-	ENST00000360182	Human mRNA for T-cell receptor V beta gene segment V-beta-6, clone IGRb10	3,46	2,90
5272	SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	2,92	2,89
-	A_24_P33429	non-RefSeq gene	0,22	2,89
-	A_32_P184039	non-RefSeq gene	2,00	2,89
8464	SUPT3H	suppressor of Ty 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,91	2,89
-	BG216680	RST36374 Athersys RAGE Library Homo sapiens cDNA	0,72	2,88
81606	LBH	limb bud and heart development homolog (mouse)	3,46	2,88

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
26053	AUTS2	autism susceptibility candidate 2	4,72	2,88
-	A_24_P221105	non-RefSeq gene	0,34	2,88
421	ARVCF	armadillo repeat gene deleted in velocardiofacial syndrome	4,07	2,86
6281	S100A10	S100 calcium binding protein A10	0,57	2,86
3081	HGD	homogentisate 1,2-dioxygenase	2,83	2,86
6689	SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	1,68	2,86
-	AJ519285	partial mRNA for IgM immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV gene)	2,83	2,85
57493	HEG1	HEG homolog 1 (zebrafish)	4,07	2,84
9450	LY86	lymphocyte antigen 86	2,00	2,84
432	ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	1,68	2,83
3111	HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	1,20	2,82
-	BC067907	cDNA clone IMAGE:30330955	4,07	2,82
909	CD1A	CD1a molecule	3,46	2,82
3116	HLA-DPB2	major histocompatibility complex, class II, DP beta 2 (pseudogene)	1,02	2,82
-	ENST00000297812	ribosomal protein L36a pseudogene 6	0,44	2,81
-	BC024289	cDNA clone MGC:39273 IMAGE:5440834	4,07	2,81
1028	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	1,68	2,80
728489	DNLZ	DNL-type zinc finger	1,02	2,80
100131581	LOC100131581	hypothetical LOC100131581	0,57	2,79
124152	IQCK	IQ motif containing K	1,02	2,79
-	THC2415754	Q9Y6H2 (Q9Y6H2) Ku70-binding protein (Fragment), partial (41%)	0,91	2,79
10125	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	3,46	2,79
1290	COL5A2	collagen, type V, alpha 2	1,68	2,79
1043	CD52	CD52 molecule	1,68	2,79
-	A_24_P118281	non-RefSeq gene	0	2,79

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
6001	RGS10	regulator of G-protein signaling 10	4,72	2,79
100128355	LOC100128355	ribosomal protein S27a pseudogene	0	2,79
53347	UBASH3A	ubiquitin associated and SH3 domain containing A	2,00	2,79
643	CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	4,72	2,77
3109	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	2,39	2,77
401431	LOC401431	hypothetical LOC401431	2,83	2,77
8277	TKTL1	transketolase-like 1	2,39	2,77
84433	CARD11	caspase recruitment domain family, member 11	3,46	2,76
-	A_24_P204664	non-RefSeq gene	0	2,76
11123	RCAN3	RCAN family member 3	2,00	2,76
1380	CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	0,34	2,75
8445	DYRK2	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	1,77	2,75
50615	IL21R	interleukin 21 receptor	3,46	2,75
321	APBA2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2	2,00	2,75
6775	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	2,54	2,74
340508	LOC340508	growth arrest-specific 2 like 1 pseudogene	4,72	2,73
911	CD1C	CD1c molecule	1,02	2,73
-	THC2314599	C40201 artifact-warning sequence (translated ALU class C) - human {Homo sapiens;} , partial (13%)	2,83	2,73
23231	SEL1L3	sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)	2,00	2,72
55619	DOCK10	dedicator of cytokinesis 10	1,15	2,72
8573	CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	3,46	2,72
-	A_24_P409402	non-RefSeq gene	0	2,72
-	A_24_P685729	non-RefSeq gene	0	2,71
5324	PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1	1,15	2,71

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change‡</b>
57504	MTA3	metastasis associated 1 family, member 3	1,15	2,71
59347	FKSG2	tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene	0,44	2,71
-	A_24_P101480	non-RefSeq gene	0	2,71
-	A_24_P135551	non-RefSeq gene	0	2,70
6915	TBXA2R	thromboxane A2 receptor	0	2,70
11278	KLF12	Kruppel-like factor 12	4,72	2,70
923	CD6	CD6 molecule	3,46	2,70
-	THC2405710	non-RefSeq gene	0,57	2,70
2350	FOLR2	folate receptor 2 (fetal)	1,33	2,69
-	THC2314823	non-RefSeq gene	2,00	2,69
5361	PLXNA1	plexin A1	3,46	2,69
9882	TBC1D4	TBC1 domain family, member 4	4,07	2,69
-	A_24_P930487	non-RefSeq gene	2,39	2,69
-	A_24_P358390	non-RefSeq gene	0	2,69
5368	PNOC	prepronociceptin	1,68	2,69
81671	VMP1	vacuole membrane protein 1	3,46	2,69
-	A_24_P332504	non-RefSeq gene	0	2,68
3109	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	1,33	2,68
155066	ATP6V0E2	ATPase, H+ transporting V0 subunit e2	2,00	2,68
302	ANXA2	annexin A2	2,72	2,68
-	A_24_P850187	non-RefSeq gene	0,22	2,67
112464	PRKCDBP	protein kinase C, delta binding protein	2,00	2,67
64167	ERAP2	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	1,33	2,67
-	AF088007	full length insert cDNA clone YY74A01	1,02	2,67
-	THC2347909	non-RefSeq gene	4,72	2,67
83955	NACAP1	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide pseudogene 1	0	2,67

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change‡</b>
158219	TTC39B	tetratricopeptide repeat domain 39B	4,07	2,67
-	A_24_P203814	non-RefSeq gene	0,22	2,66
10634	GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1	4,72	2,66
-	A_24_P238186	non-RefSeq gene	1,02	2,65
10123	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	4,07	2,65
7597	ZBTB25	zinc finger and BTB domain containing 25	2,83	2,65
80237	ELL3	elongation factor RNA polymerase II-like 3	1,68	2,65
57732	ZFYVE28	zinc finger, FYVE domain containing 28	4,72	2,65
55013	CCDC109B	coiled-coil domain containing 109B	1,15	2,65
-	THC2365017	HSU02032 ribosomal protein L23a {Homo sapiens;} , partial (89%)	0	2,64
1776	DNASE1L3	deoxyribonuclease I-like 3	2,00	2,64
-	A_24_P565898	non-RefSeq gene	2,39	2,64
130916	MTERFD2	MTERF domain containing 2	0,51	2,64
-	A_23_P89841	non-RefSeq gene	2,83	2,63
-	AV757313	cDNA clone BMBAGF02 5'	0	2,63
100510687	LOC100510687	HLA class II histocompatibility antigen, DR beta 3 chain-like	2,00	2,63
-	AY129023	clone FP18821 unknown mRNA	1,68	2,63
114904	C1QTNF6	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	2,83	2,62
-	A_24_P483956	non-RefSeq gene	2,83	2,61
26262	TSPAN17	tetraspanin 17	0,91	2,61
145864	HAPLN3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	2,39	2,61
6697	SPR	sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)	4,07	2,61
-	THC2290169	Q6A646 (Q6A646) Amidase, partial (43%)	0,51	2,61
7782	SLC30A4	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4	3,46	2,61
-	A_24_P75558	non-RefSeq gene	0,72	2,61

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
3710	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	3,46	2,61
-	THC2281914	AF463524 ribonucleoprotein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 {Mus musculus;} , partial (29%)	2,39	2,61
439949	LOC439949	hypothetical LOC439949	0,51	2,60
-	THC2431726	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination warning entry, partial (7%)	0,34	2,60
5125	PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	2,39	2,60
-	A_24_P127442	non-RefSeq gene	0	2,60
-	A_24_P178723	non-RefSeq gene	0,34	2,60
23328	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	4,72	2,60
-	A_24_P409361	non-RefSeq gene	0	2,60
2670	GFAP	glial fibrillary acidic protein	0,44	2,59
3109	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	2,83	2,59
84033	OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	0,91	2,59
-	LOC392506	PREDICTED: Homo sapiens similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (LOC392506)	0	2,59
6876	TAGLN	transgelin	0,44	2,59
6448	SGSH	N-sulfoglucosamine sulfohydrolase	1,02	2,58
3113	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	1,45	2,58
-	AB063923	IGH mRNA for immunoglobulin heavy chain VHDJ region	4,72	2,58
2308	FOXO1A	forkhead box O1	0,74	2,58
-	A_24_P213375	non-RefSeq gene	0	2,58
170575	GIMAP1	GTPase, IMAP family member 1	4,72	2,57
-	AL833005	cDNA DKFZp666D074 (from clone DKFZp666D074)	4,72	2,57
596	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	3,70	2,57
2864	FFAR1	free fatty acid receptor 1	0,22	2,57

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
-	A_24_P358205	non-RefSeq gene	0	2,57
1521	CTSW	cathepsin W	1,66	2,56
55266	TMEM19	transmembrane protein 19	0,57	2,56
3397	ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	2,00	2,56
-	THC2440229	non-RefSeq gene	4,72	2,56
3572	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,68	2,56
9026	HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	0,74	2,55
152137	CCDC50	coiled-coil domain containing 50	2,83	2,55
9440	MED17	mediator complex subunit 17	2,00	2,54
9806	SPOCK2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2	3,46	2,54
115350	FCRL1	Fc receptor-like 1	2,83	2,54
5026	P2RX5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	1,02	2,53
5739	PTGIR	prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	2,83	2,53
-	A_23_P83991	non-RefSeq gene	1,33	2,53
-	BX095032	cDNA clone IMAGp998E17244	4,07	2,52
2323	FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	2,83	2,51
4063	LY9	lymphocyte antigen 9	3,46	2,51
55007	FAM118A	family with sequence similarity 118, member A	4,72	2,51
254428	SLC41A1	solute carrier family 41, member 1	3,46	2,51
54753	ZNF853	zinc finger protein 853	2,39	2,51
-	A_24_P464798	non-RefSeq gene	0	2,51
112611	RWDD2A	RWD domain containing 2A	0,72	2,51
-	ENST00000361855	non-RefSeq gene	0	2,51
117157	SH2D1B	SH2 domain containing 1B	4,07	2,51
-	AF336795	NM-4 mRNA	2,83	2,50

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
1731	SEPT1	septin 1	3,46	2,50
-	A_24_P290188	non-RefSeq gene	4,72	2,50
-	A_24_P418517	non-RefSeq gene	0	2,50
-	CA307890	cDNA clone UI-H-FT1-bib-a-05-0-UI	1,33	2,49
3003	GZMK	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)	4,72	2,49
	CA437634	cDNA clone UI-H-DH0-aup-d-15-0-UI	3,46	2,49
84033	OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	2,65	2,48
122618	PLD4	phospholipase D family, member 4	0,57	2,48
2043	EPHA4	EPH receptor A4	2,61	2,48
-	THC2360930	HSL31 ribosomal protein L31	1,33	2,48
-	AK025975	FLJ22322 fis	2,39	2,47
-	ENST00000247761	similar to 40S ribosomal protein S20 (LOC652487)	0	2,47
-	A_23_P136392	non-RefSeq gene	2,83	2,47
2534	FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	1,47	2,47
8573	CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	3,46	2,46
115650	TNFRSF13C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C	1,15	2,46
90990	KIFC2	kinesin family member C2	0,72	2,46
259173	ALS2CL	ALS2 C-terminal like	1,68	2,46
196403	DTX3	deltex homolog 3 (Drosophila)	3,46	2,45
11326	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	1,68	2,45
728743	LOC728743	zinc finger protein pseudogene	2,39	2,45
51754	TMEM8B	transmembrane protein 8B	2,83	2,45
-	A_24_P195556	non-RefSeq gene	0	2,45
924	CD7	CD7 molecule	1,02	2,44
9743	ARHGAP32	Rho GTPase activating protein 32	0,34	2,44
93611	FBXO44	F-box protein 44	2,83	2,44

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change‡</b>
7433	VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1	3,46	2,44
-	LOC391124	PREDICTED: Homo sapiens similar to 60S ribosomal protein L27a (LOC391124)	0	2,44
8510	MMP23B	matrix metalloproteinase 23B	3,46	2,44
84662	GLIS2	GLIS family zinc finger 2	4,07	2,43
57519	STARD9	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 9	4,72	2,43
4673	NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	0	2,43
256236	NAPSB	napsin B aspartic peptidase pseudogene	4,72	2,43
	A_24_P169855	non-RefSeq gene	0	2,43
133746	JMY	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor	1,33	2,42
-	BC047952	clone IMAGE:5785547	0	2,42
80154	AGSK1	golgin subfamily A member 2-like	3,46	2,42
-	THC2323620	non-RefSeq gene	1,33	2,42
51466	EVL	Enah/Vasp-like	2,42	2,42
9022	CLIC3	chloride intracellular channel 3	4,72	2,42
55024	BANK1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	2,83	2,42
-	A_24_P135771	non-RefSeq gene	0	2,42
780	DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	2,39	2,42
2113	ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	1,68	2,41
-	A_24_P204165	non-RefSeq gene	0	2,41
267010	RNU12	RNA, U12 small nuclear	2,00	2,41
-	THC2438936	non-RefSeq gene	2,83	2,41
30812	SOX8	SRY (sex determining region Y)-box 8	2,14	2,41
26249	KLHL3	kelch-like 3 (Drosophila)	0,91	2,41
166	AES	amino-terminal enhancer of split	2,00	2,41
-	A_24_P204574	non-RefSeq gene	4,07	2,41
79722	ANKRD55	ankyrin repeat domain 55	4,07	2,40

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
7466	WFS1	Wolfram syndrome 1 (wolframin)	2,83	2,40
10723	SLC12A7	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 7	1,84	2,40
55342	STRBP	spermatid perinuclear RNA binding protein	1,15	2,40
25939	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	2,83	2,40
	A_24_P531074	non-RefSeq gene	4,72	2,40
3590	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	1,02	2,40
5533	PPP3CC	protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isozyme	1,33	2,39
80154	AGSK1	golgin subfamily A member 2-like	4,72	2,39
972	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	3,46	2,39
132299	OCIAD2	OCIA domain containing 2	1,33	2,39
50861	STMN3	stathmin-like 3	0,96	2,38
100129196	LOC100129196	hypothetical LOC100129196	1,33	2,38
-	ENST00000383097	MHC HLA-SX-alpha	1,68	2,37
-	A_32_P121234	non-RefSeq gene	1,68	2,37
-	A_24_P323974	non-RefSeq gene	0,51	2,37
6925	TCF4	transcription factor 4	1,02	2,37
155060	LOC155060	AI894139 pseudogene	0,57	2,37
22852	ANKRD26	ankyrin repeat domain 26	0,91	2,37
6638	SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	0,57	2,37
400961	PAIP2B	poly(A) binding protein interacting protein 2B	3,46	2,36
-	AK092349	cDNA FLJ35030 fis	3,46	2,36
-	A_32_P190864	non-RefSeq gene	2,39	2,36
339390	CLEC4G	C-type lectin domain family 4, member G	4,72	2,36
11118	BTN3A2	butyrophilin, subfamily 3, member A2	2,00	2,36
3127	HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	2,83	2,36
-	A_24_P187094	non-RefSeq gene	2,00	2,36

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
84765	ZNF577	zinc finger protein 577	0,22	2,35
-	MGC39900	hypothetical protein MGC39900	2,83	2,35
256949	KANK3	KN motif and ankyrin repeat domains 3	3,46	2,35
286097	EFHA2	EF-hand domain family, member A2	4,07	2,35
25894	PLEKHG4	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4	0,51	2,35
116843	C6orf192	chromosome 6 open reading frame 192	4,72	2,35
57198	ATP8B2	ATPase, class I, type 8B, member 2	2,39	2,35
-	THC2281336	non-RefSeq gene	3,46	2,34
-	ENST00000341569	non-RefSeq gene	1,02	2,34
-	THC2435420	non-RefSeq gene	2,39	2,34
28951	TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	4,72	2,34
123283	TARSL2	threonyl-tRNA synthetase-like 2	4,72	2,34
-	A_24_P75778	non-RefSeq gene	0,72	2,34
-	THC2419501	RL31_HUMAN (P62899) 60S ribosomal protein L31, partial (97%)	1,33	2,33
286046	XKR6	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6	4,72	2,33
-	A_24_P238427	non-RefSeq gene	0	2,33
-	A_24_P289753	non-RefSeq gene	0,22	2,33
-	A_24_P67378	non-RefSeq gene	2,83	2,33
219972	MPEG1	macrophage expressed 1	1,68	2,33
51226	COPZ2	coatamer protein complex, subunit zeta 2	4,72	2,33
6146	RPL22	ribosomal protein L22	0,34	2,32
92106	OXNAD1	oxidoreductase NAD-binding domain containing 1	1,24	2,32
-	M27126	lymphocyte antigen (DRw8) mRNA	4,07	2,32
2947	GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	2,04	2,32
-	A_24_P92744	non-RefSeq gene	0	2,32

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
3115	HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	2,83	2,32
-	AK091308	cDNA FLJ33989 fis	1,33	2,31
-	THC2400714	non-RefSeq gene	2,83	2,31
-	U94903	Human soluble CD44 (CD44) mRNA, with exon v10 extension	3,46	2,31
340371	NRBP2	nuclear receptor binding protein 2	1,15	2,31
10489	LRRC41	leucine rich repeat containing 41	3,46	2,31
22902	RUFY3	RUN and FYVE domain containing 3	2,00	2,31
165	AEBP1	AE binding protein 1	0,72	2,31
-	AK130207	cDNA FLJ26697 fis	0	2,31
-	A_24_P290068	non-RefSeq gene	1,02	2,31
23231	KIAA0746	sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)	2,83	2,30
824	CAPN2	calpain 2, (m/II) large subunit	3,46	2,30
-	AK023328	cDNA FLJ13266 fis	0,34	2,30
10133	OPTN	optineurin	4,72	2,30
10447	FAM3C	family with sequence similarity 3, member C	0,72	2,29
-	A_24_P341006	non-RefSeq gene	0,91	2,29
-	A_24_P50381	non-RefSeq gene	1,33	2,29
973	CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	0,22	2,29
26119	LDLRAP1	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	3,46	2,29
5184	PEPD	peptidase D	0,44	2,29
65055	REEP1	receptor accessory protein 1	3,46	2,28
23261	CAMTA1	calmodulin binding transcription activator 1	2,00	2,28
-	AA991488	cDNA clone IMAGE:1612769 3' similar to gb:J00194 HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DR ALPHA CHAIN (HUMAN)	2,39	2,28
9497	SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	2,90	2,28
958	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	2,33	2,28

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
-	AD7C-NTP	neuronal thread protein AD7c-NTP mRNA	0	2,28
-	A_24_P32708	non-RefSeq gene	1,15	2,28
3572	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,02	2,28
322	APBB1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65)	1,86	2,28
27075	TSPAN13	tetraspanin 13	3,46	2,27
23353	SUN1	Sad1 and UNC84 domain containing 1	1,15	2,27
100129434	LOC100129434	hypothetical LOC100129434	1,15	2,27
666	BOK	BCL2-related ovarian killer	2,39	2,27
3993	LLGL2	lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)	4,07	2,27
57048	PLSCR3	phospholipid scramblase 3	0,91	2,27
100289678	ZNF783	zinc finger family member 783	2,00	2,27
4352	MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene	4,07	2,26
8356	HIST1H3J	histone cluster 1, H3j	2,83	2,26
-	A_24_P280953	non-RefSeq gene	0	2,26
-	THC2314822	NOA1_HUMAN (Q9NY12) Nucleolar protein family A member 1 (snoRNP protein GAR1) (H/ACA ribonucleoprotein GAR1), partial (18%)	2,83	2,26
10225	CD96	CD96 molecule	2,38	2,26
-	A_24_P24150	non-RefSeq gene	0	2,26
117145	THEM4	thioesterase superfamily member 4	2,00	2,25
-	AA451906	cDNA clone IMAGE:786679 3'	2,00	2,25
376267	RAB15	RAB15, member RAS oncogene family	4,07	2,25
284129	SLC26A11	solute carrier family 26, member 11	4,07	2,25
5569	PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	2,83	2,25
100506029	LOC100506029	hypothetical LOC100506029	2,00	2,24
79791	FBXO31	F-box protein 31	1,15	2,24
-	THC2409569	non-RefSeq gene	4,07	2,24

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
27023	FOXB1	forkhead box B1	2,00	2,24
916	CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	1,15	2,24
-	A_24_P127042	non-RefSeq gene	2,83	2,24
-	BC032091	cDNA clone IMAGE:3874046	1,02	2,24
27439	CECR6	cat eye syndrome chromosome region, candidate 6	2,39	2,24
-	A_24_P477353	non-RefSeq gene	0	2,24
605	BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A	2,39	2,23
9710	KIAA0355	KIAA0355	4,72	2,23
10644	IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	4,72	2,23
-	A_24_P118813	non-RefSeq gene	2,00	2,23
-	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 (HLA-DQB1)	2,39	2,23
-	A_23_P15233	non-RefSeq gene	0,34	2,23
-	ENST00000252509	(similar to ribosomal protein L36)	0,22	2,23
8926	SNURF	SNRPN upstream reading frame	1,15	2,22
4008	LMO7	LIM domain 7	1,66	2,22
8556	CDC14A	CDC14 cell division cycle 14 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,33	2,22
118433	RPL23AP7	ribosomal protein L23a pseudogene 7	0,73	2,22
-	A_24_P93452	non-RefSeq gene	0	2,22
-	THC2380864	O61351 (O61351) CG12794-PA (La costa), partial (10%)	1,33	2,22
-	A_23_P143676	non-RefSeq gene	4,72	2,21
266655	NCRNA00094	non-protein coding RNA 94	1,02	2,21
284613	CYB561D1	cytochrome b-561 domain containing 1	2,00	2,21
-	A_24_P392271	non-RefSeq gene	0,22	2,21
-	A_24_P152775	non-RefSeq gene	0	2,20
-	A_24_P289884	non-RefSeq gene	0	2,20
404672	GTF2H5	general transcription factor IIH, polypeptide 5	2,83	2,20

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
26012	NELF	nasal embryonic LHRH factor	2,39	2,20
	A_24_P675947	non-RefSeq gene	0	2,20
5176	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	2,00	2,19
541472	LOC541472	hypothetical LOC541472	0	2,19
-	A_24_P164815	non-RefSeq gene	1,68	2,19
388574	FLJ43681	ribosomal protein L23a pseudogene	0,47	2,19
-	AK025430	cDNA: FLJ21777 fis	1,68	2,19
5150	PDE7A	phosphodiesterase 7A	2,83	2,19
9057	SLC7A6	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 6	2,83	2,18
-	THC2270926	RS2_HUMAN (P15880) 40S ribosomal protein S2 (S4) (LLRep3 protein), partial (85%)	0	2,18
148641	SLC35F3	solute carrier family 35, member F3	2,83	2,18
51149	C5orf45	chromosome 5 open reading frame 45	1,17	2,18
57228	SMAGP	small cell adhesion glycoprotein	4,72	2,18
-	BE044472	cDNA clone IMAGE:3040397	1,33	2,18
-	THC2308299	RATASI amino acid starvation-induced protein {Rattus norvegicus;} , partial (87%)	0	2,18
-	THC2345721	non-RefSeq gene	1,68	2,18
-	THC2312955	BC021290 IGF-II mRNA-binding protein 2 {Homo sapiens;} , partial (3%)	1,15	2,17
326625	MMAB	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	3,46	2,17
-	A_24_P101271	non-RefSeq gene	0	2,17
-	A_24_P383569	non-RefSeq gene	0	2,17
-	AF116678	PRO1995 mRNA	2,83	2,17
10929	SRSF8	serine/arginine-rich splicing factor 8	2,39	2,17
-	A_24_P913620	non-RefSeq gene	1,02	2,17
64061	TSPYL2	TSPY-like 2	0,22	2,17

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
-	THC2367544	non-RefSeq gene	3,46	2,17
171425	CLYBL	citrate lyase beta like	0,57	2,17
3770	KCNJ14	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14	2,00	2,17
282969	C10orf125	chromosome 10 open reading frame 125	0,96	2,16
55796	MBNL3	muscleblind-like 3 (Drosophila)	1,02	2,16
-	A_24_P169645	non-RefSeq gene	0	2,16
3123	HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	3,51	2,16
9466	IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha	3,76	2,15
100287628	LOC100287628	hypothetical LOC100287628	0,91	2,15
11247	NXPH4	neurexophilin 4	0	2,15
-	A_24_P280933	non-RefSeq gene	0	2,15
26287	ANKRD2	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)	0	2,14
285966	FAM115C	family with sequence similarity 115, member C	4,07	2,14
-	A_24_P7181	non-RefSeq gene	0	2,14
-	THC2376828	HUMTNL22 ORF2 contains a reverse transcriptase domain. {Homo sapiens;} , partial (7%)	2,30	2,14
-	ENST00000309379	similar to ribosomal protein L30 (LOC442251)	0	2,14
-	THC2429183	PTNI_HUMAN (Q99952) Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 18 (Brain-derived phosphatase) , partial (6%)	4,72	2,13
-	A_24_P505981	non-RefSeq gene	0	2,13
23081	KDM4C	lysine (K)-specific demethylase 4C	0,44	2,13
26751	SH3YL1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1 (S. cerevisiae)	2,00	2,13
10480	EIF3M	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M	0,44	2,13
3061	HCRTR1	hypocretin (orexin) receptor 1	0,44	2,13
-	AK021593	cDNA FLJ11531 fis	1,33	2,13
27076	LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	4,72	2,13
3983	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	3,46	2,13

GeneID	Símbolo do gene	Descrição do gene	q-value*	Fold Change‡
170463	SSBP4	single stranded DNA binding protein 4	2,00	2,13
-	THC2288230	non-RefSeq gene	0,22	2,12
338799	LOC338799	hypothetical LOC338799	0,22	2,12
100132147	LOC100132147	hypothetical LOC100132147	4,72	2,12
5613	PRKX	protein kinase, X-linked	2,00	2,12
57134	MAN1C1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	3,46	2,12
-	A_24_P255763	non-RefSeq gene	0,34	2,12
11119	BTN3A1	butyrophilin, subfamily 3, member A1	3,46	2,12
231	AKR1B1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	1,68	2,11
285195	SLC9A9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9	4,72	2,11
92597	MOBK1A	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A (yeast)	3,46	2,11
-	A_24_P410117	non-RefSeq gene	0	2,11
-	A_24_P367369	non-RefSeq gene	0	2,11
7169	TPM2	tropomyosin 2 (beta)	3,46	2,11
63027	SLC22A23	solute carrier family 22, member 23	4,07	2,11
4302	MLLT6	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6	3,46	2,11
157285	SGK223	homolog of rat pragma of Rnd2	4,07	2,11
6369	CCL24	chemokine (C-C motif) ligand 24	0	2,09
-	A_24_P33525	non-RefSeq gene	0	2,09
64219	PJA1	praja ring finger 1	4,07	2,09
303	ANXA2P1	annexin A2 pseudogene 1	3,46	2,09
-	A_24_P306964	non-RefSeq gene	0	2,09
-	AK022479	cDNA FLJ12417 fis	4,07	2,09
-	A_23_P200955	non-RefSeq gene	0	2,09
4613	MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	3,46	2,09

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
26112	CCDC69	coiled-coil domain containing 69	2,39	2,09
	BQ188033	cDNA clone UI-E-EJ1-aju-o-13-0-UI	0,22	2,08
10384	BTN3A3	butyrophilin, subfamily 3, member A3	3,46	2,08
2686	GGT7	gamma-glutamyltransferase 7	4,72	2,08
23507	LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, member B	4,07	2,08
-	THC2280475	AI565054 tq79a09.x1 NCI_CGAP_Ut1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2215000	1,33	2,08
-	AF116713	PRO2769 mRNA	0,72	2,08
-	AL137354	cDNA DKFZp434A0326 (from clone DKFZp434A0326)	0	2,08
-	BC057844	cDNA clone MGC:71846 IMAGE:5313492	4,72	2,08
100133224	LOC100133224	hypothetical protein LOC100133224	0,34	2,08
84883	AIFM2	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2	4,07	2,08
11238	CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	4,07	2,08
11010	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1	2,39	2,08
-	A_24_P332292	non-RefSeq gene	0,22	2,08
-	ENST00000310822	similar to ribosomal protein L21 isoform 1 (LOC388532)	0,22	2,07
256987	SERINC5	serine incorporator 5	1,15	2,07
387119	C6orf204	chromosome 6 open reading frame 204	3,46	2,07
100506687	LOC100506687	hypothetical LOC100506687	0,57	2,07
514	ATP5E	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	4,72	2,07
-	G36631	STS cDNA, sequence tagged site	2,39	2,07
-	A_24_P25040	non-RefSeq gene	4,07	2,07
-	THC2441239	non-RefSeq gene	3,46	2,06
81539	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	1,68	2,06
-	A_24_P401321	non-RefSeq gene	0,22	2,06
80342	TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	4,07	2,06
29969	MDFIC	MyoD family inhibitor domain containing	3,46	2,06

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change‡</b>
54700	RRN3	RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog (S. cerevisiae)	0,91	2,06
-	THC2281165	AY491776 alpha 1A adrenoceptor isoform 2c {Homo sapiens;} , partial (11%)	0	2,06
-	A_24_P349539	non-RefSeq gene	4,72	2,05
84277	DNAJC30	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 30	1,02	2,05
9214	FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	1,33	2,05
283953	TMEM114	transmembrane protein 114	3,46	2,05
-	BQ188318	cDNA clone UI-E-EJ1-ajw-c-17-0-UI	4,07	2,05
1822	ATN1	atrophin 1	1,68	2,05
9063	PIAS2	protein inhibitor of activated STAT, 2	3,46	2,05
-	THC2274685	AF326941 5H1 {Caenorhabditis elegans;} , partial (16%)	4,72	2,05
54549	SDK2	sidekick homolog 2 (chicken)	0,44	2,05
4302	MLLT6	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6	2,39	2,04
129303	TMEM150	transmembrane protein 150A	0,91	2,04
50805	IRX4	iroquois homeobox 4	4,72	2,04
-	A_32_P23872	non-RefSeq gene	4,07	2,04
-	A_24_P229848	non-RefSeq gene	0	2,04
117145	THEM4	thioesterase superfamily member 4	2,00	2,04
402176	RPL21P44	ribosomal protein L21 pseudogene 44	0	2,04
-	THC2359128	RS13_CHICK (Q6ITC7) 40S ribosomal protein S13, partial (48%)	0	2,04
9148	NEURL	neuralized homolog (Drosophila)	2,83	2,03
3108	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	1,68	2,03
8434	RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	1,02	2,03
2797	GNRH2	gonadotropin-releasing hormone 2	0	2,03
54463	FAM134B	family with sequence similarity 134, member B	2,00	2,02

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
57189	KIAA1147	KIAA1147	2,00	2,02
6152	RPL24	ribosomal protein L24	0	2,02
36	ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	2,83	2,02
7439	BEST1	bestrophin 1	1,68	2,02
266675	BEST4	bestrophin 4	0	2,02
-	ENST00000308989	non-RefSeq gene	0	2,02
-	A_23_P21882	non-RefSeq gene	2,39	2,02
246330	PELI3	pellino homolog 3 (Drosophila)	3,46	2,02
1368	CPM	carboxypeptidase M	2,00	2,02
960	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	0,40	2,02
54462	FAM190B	family with sequence similarity 190, member B	2,00	2,01
9064	MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	2,39	2,01
158055	C9orf163	chromosome 9 open reading frame 163	0	2,01
-	A_24_P178693	non-RefSeq gene	0	2,01
-	A_32_P173922	non-RefSeq gene	3,46	2,01
-	A_24_P281304	non-RefSeq gene	0	2,01
55691	FRMD4A	FERM domain containing 4 <sup>a</sup>	4,07	2,01
84310	C7orf50	chromosome 7 open reading frame 50	0,91	2,01
441317	FAM90A7	family with sequence similarity 90, member A7	2,83	2,01
390595	LOC390595	ubiquitin-associated protein 1-like	0,91	2,00
389136	VGLL3	vestigial like 3 (Drosophila)	0,34	2,00
-	A_32_P172002	non-RefSeq gene	3,46	2,00
10625	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein	1,02	-2,12
1432	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	2,87	-2,14
8897	MTMR3	myotubularin related protein 3	2,39	-2,17
134957	STXBP5	syntaxin binding protein 5 (tomosyn)	4,72	-2,30
9759	HDAC4	histone deacetylase 4	4,72	-2,30

<b>GeneID</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>q-value*</b>	<b>Fold Change<sup>‡</sup></b>
283651	HMG2P46	high mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 46	0,57	-2,38
29994	BAZ2B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	4,72	-2,38
81602	CDADC1	cytidine and dCMP deaminase domain containing 1	4,72	-2,43
3151	HMG2	high mobility group nucleosomal binding domain 2	0,22	-2,43
6279	S100A8	S100 calcium binding protein A8	0	-2,45
121512	FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	2,83	-2,50
5552	SRGN	serglycin	0,37	-2,58
53829	P2RY13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	4,07	-2,60
6280	S100A9	S100 calcium binding protein A9	4,07	-2,62
317	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	0,37	-2,63
241	ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	2,39	-2,70
79056	PRRG4	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	2,00	-2,75
57136	C20orf3	chromosome 20 open reading frame 3	2,39	-2,82
-	A_32_P55414	non-RefSeq gene	3,46	-2,85
-	AA303143	Uterus tumor I Homo sapiens cDNA 5' end similar to hypothetical protein KIAA0222	4,07	-2,98
3240	HP	haptoglobin	2,39	-3,13
6286	S100P	S100 calcium binding protein P	0	-3,33
-	A_32_P32315	non-RefSeq gene	4,72	-3,38
4318	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	1,37	-3,46
1668	DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	0,37	-3,50
820	CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	2,39	-3,52
202243	CCDC125	coiled-coil domain containing 125	4,72	-3,59
1669	DEFA4	defensin, alpha 4, corticostatin	1,02	-3,95
-	THC2406727	non-RefSeq gene	4,72	-3,98
266747	RGL4	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 4	4,07	-4,54

\* *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). † *Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.

**Apêndice 11.** As cinco funções biológicas mais significativamente enriquecidas para os genes diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM, segundo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
Desenvolvimento Celular	↑ANXA2, ↓APAF1, ↑APBB1, ↑ARHGAP32, ↑ARID5B, ↑ATN1, ↑AXIN2, ↑BACH2, ↑BCL11B, ↑BCL2, ↑BIN1, ↑BLK, ↑BTN3A1, ↑CAMK4, ↓CAMP, ↑CARD11, ↑CCR7, ↑CD2, ↑CD19, ↑CD27, ↑CD28, ↑CD3D, ↑CD3E, ↑CD3G, ↑CD22, ↑CD40, ↑CD44, ↑CD6, ↑CD72, ↑CD74, ↑CD163, ↑CD79A, ↑CD79B, ↑CD8A, ↑CD8B, ↑CDKN1C, ↑CIITA, ↑CLEC10A, ↑CR2, ↑CXCR5, ↑DAB2, ↑DDR1, ↑EPHA4, ↑ETS1, ↑FLT3LG, ↑FOXO1, ↑FYN, ↑GAS2L1, ↑GLIS2, ↓HDAC4, ↑HLA-DMA, ↑HLA-DOA, ↑HLA-DQB1, ↑HLA-DRB1, ↑HOXB4, ↑ICOSLG, ↑ID1, ↑IGHG1, ↑IGK@, ↑IL11RA, ↑IL21R, ↑IL23A, ↑IL27RA, ↑IL6ST, ↑IL7R, ↑INPP4B, ↑ITK, ↑KLF9, ↑LBH, ↑LCK, ↑LEF1, ↑LILRB1, ↑LTBP3, ↑LY86, ↑LY9, ↑MAL, ↓MAPK14, ↑MBNL3, ↓MMP9, ↑MPL, ↑MS4A1, ↑MYCN, ↑NR1D1, ↑NRG1, ↑PACSIN1, ↑PIAS2, ↑PLXNB2, ↑POU2AF1, ↑PRKX, ↑RASGRP1, ↑RGL4, ↑RGS10, ↑RORA, ↑RPL22, ↓S100A8, ↓S100A9, ↑S100B, ↑SERPINB9, ↑SERPINF1, ↑SKAP1, ↑SOX8, ↑SPIB, ↑SPON2, ↓SRGN, ↑STAT4, ↑TCF4, ↑TCF7, ↑TCL1A, ↑TNFRSF13C, ↑TNFRSF25, ↑TRIB2, ↑TXK, UBASH3A, ↑VSIG4, ↑ZAP70, ↑ZBTB32	1,25E-14 - 1,23E-01	116
Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico	↓ALOX5AP, ↑ANXA2, ↑ARID5B, ↓APAF1, ↑BACH2, ↑BANK1, ↑BCL11B, ↑BCL2, ↑BLK, ↑BTN3A1, ↑CAMK4, ↓CAMP, ↑CARD11, ↑CCL24, ↑CCR7, ↑CD163, ↑CD19, ↑CD1A, ↑CD1C, ↑CD2, ↑CD22, ↑CD27, ↑CD28, ↑CD3D, ↑CD3E, ↑CD3G, ↑CD40, ↑CD44, ↑CD52, ↑CD6, ↑CD7, ↑CD72, ↑CD74, ↑CD79A, ↑CD79B, ↑CD8A, ↑CD8B, ↑CDKN1C, ↑CIITA, ↑CLEC10A, ↑CR2, ↑CXCR5, ↑DDR1, ↓DEFA1, ↑EPHA4, ↑ETS1, ↑FAIM3, ↑FLT3LG, ↑FOXO1, ↑FSTL1, ↑FYN, ↑GAS2L1, ↑GFAP, ↑GLIS2, ↑GNRH2, ↑GZMA, ↑GAS2L1, ↓HDAC4, ↑HLA-DMA, ↑HLA-DOA, ↑HLA-DQB1, ↑HLA-DRA, ↑HLA-DRB1, ↑HOXB4, ↓HP, ↑ICOSLG, ↑ID1, ↑IGK@, ↑IGHG1,	1,25E-14 - 1,23E-01	127

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
	<p>↑IL11RA, ↑IL21R, ↑IL23A, ↑IL27RA, ↑IL6ST, ↑IL7R, ↑ITK, ↑KLF9, ↑LCK, ↑LEF1, ↑LILRB1, ↑LY86, ↑LY9, ↓MAPK14, ↑MARCO, ↓MMP9, ↑MPL, ↑MS4A1, ↑MSN, ↑MYCN, ↑NCR3, ↑NRG1, ↑PANX1, ↑PLA2G7, ↑PLXNA1, ↑PNOC, ↑POU2AF1, ↑PTGIR, ↑PRKX, ↑RASGRP1, ↓RGL4, ↑RGS10, ↑RORA, ↑RPL22, ↑S100A10, ↓S100A8, ↓S100A9, ↑S100B, ↑SERPINB9, ↑SERPINF1, ↑SKAP1, ↑SPON2, ↑SRGN, ↑RPL22, ↑SPIB, ↑STAT4, ↑TBXA2R, ↑TCF4, ↑TCF7, ↑TGFB1, ↑TCL1A, ↑TNFRSF13C, ↑TNFRSF25, ↑TXK, ↑UBASH3A, ↑VIPR1, ↑VSIG4, ↑ZAP70</p>		
Hematopoiese	<p>↓APAF1, ↑ARID5B, ↑BACH2, ↑BCL11B, ↑BCL2, ↑BLK, ↑CAMK4, ↓CAMP, ↑CARD11, ↑CCL24, ↑CCR7, ↑CD163, ↑CD19, ↑CD2, ↑CD22, ↑CD27, ↑CD28, ↑CD3D, ↑CD3E, ↑CD3G, ↑CD40, ↑CD44, ↑CD6, ↑CD7, ↑CD72, ↑CD74, ↑CD79A, ↑CD79B, ↑CD8A, ↑CD8B, ↑CDKN1C, ↑CIITA, ↑CR2, ↑CXCR5, ↑DDR1, ↑EPHA4, ↑ETS1, ↑FLT3LG, ↑FOXO1, ↑FYN, ↓HDAC4, ↑HLA-DMA, ↑HLA-DOA, ↑HLA-DQB1, ↑HOXB4, ↑ICOSLG, ↑ID1, ↑IGHG1, ↑IL11RA, ↑IL21R, ↑IL23A, ↑IL27RA, ↑IL6ST, ↑IL7R, ↑ITK, ↑LCK, ↑LEF1, ↓MAPK14, ↓MMP9, ↑MPL, ↑MS4A1, ↑MYCN, ↑POU2AF1, ↑PRKX, ↑RASGRP1, ↑RGL4, ↑RGS10, ↑RORA, ↑RPL22, ↑SPIB, ↑STAT4, ↑TCF4, ↑TCF7, ↑TNFRSF13C, ↑TNFRSF25, ↑TXK, ↑ZAP70, ↑ZBTB32</p>	<p>1,25E-14 - 1,23E-01</p>	78
Sinalização e Interação Celular	<p>↓ALOX5AP, ↑ANK3, ↑ANXA2, ↑BCL11B, ↑BCL2, ↑BLK, ↑CAMK4, ↓CAMP (includes EG:12796), ↑CARD11, ↑CCL24, ↑CCR7, ↑CD163, ↑CD19, ↑CD1A, ↑CD1C, ↑CD2, ↑CD22, ↑CD248, ↑CD27, ↑CD28, ↑CD3D, ↑CD3E, ↑CD3G, ↑CD40, ↑CD44 (includes EG:100330801), ↑CD52, ↑CD6, ↑CD7, ↑CD72, ↑CD74, ↑CD79A, ↑CD79B, ↑CD8A, ↑CDKN1C, ↑CLEC10A, ↑CLEC4G, ↑CR2, ↑CXCR5, ↑DDR1, ↓DEFA1 (includes others), ↑EPHA4, ↑ETS1, ↑FLT3LG, ↑FOXO1, ↑FSTL1, ↑FYN, ↑GFAP, ↑GNRH2, ↑GZMA, ↑HCRTR1, ↓HDAC4, ↑HLA-DMA, ↑HLA-DMB, ↑HLA-DOA, ↑HLA-DQB1, ↑HLA-DRA, ↑HLA-DRB1, ↑HOXB4, ↑ICOSLG, ↑ID1, ↑IGHG1, ↑IGK@, ↑IL21R, ↑IL23A, ↑IL27RA, ↑IL6ST, ↑IL7R, ↑ITK, ↑LCK, ↑LILRB1, ↑LYPD3,</p>	<p>1,36E-12 - 1,23E-01</p>	101

Função	Genes	p-valor corrigido*	Número total de genes
	<p>↓MAPK14, ↑MARCO, ↓MMP9, ↑MSN, ↑NCR3, ↑NRG1 (includes EG:112400), ↑PANX1, ↑PLXNA1, ↑POU2AF1, ↑PTGIR, ↑RASGRP1, ↑RECK, ↑RORA, ↑S100A10, ↓S100A8, ↓S100A9, ↑S100B, ↑SERPINB9, ↑SERPINF1, ↑SH2D1B, ↑SKAP1, ↑SPON2, ↑STAT4, ↑TBXA2R, ↑TCL1A, ↑TNFRSF13C, ↑TNFRSF25, ↑TXK, ↑VIPR1, ↑ZAP70</p>		
Tráfego de Células do Sistema Imune	<p>↓ALOX5AP, ↑ANK3, ↑ANXA2, ↑BCL11B, ↑BCL2, ↑BLK, ↑CAMK4, ↓CAMP (includes EG:12796), ↑CARD11, ↑CCL24, ↑CCR7, ↑CD163, ↑CD19, ↑CD1A, ↑CD1C, ↑CD2, ↑CD22, ↑CD248, ↑CD27, ↑CD28, ↑CD3D, ↑CD3E, ↑CD3G, ↑CD40, ↑CD44 (includes EG:100330801), ↑CD52, ↑CD6, ↑CD7, ↑CD72, ↑CD74, ↑CD79A, ↑CD79B, ↑CD8A, ↑CDKN1C, ↑CIITA, ↑CLEC10A, ↑CLEC4G, ↑CR2, ↑CXCR5, ↑DDR1, ↓DEFA1 (includes others), ↑EPHA4, ↑ETS1, ↑EVL, ↑FLT3LG, ↑FOXO1, ↑FSTL1, ↑FYN, ↑GFAP, ↑GLIS2, ↑GNRH2, ↑GZMA, ↑HCRTR1, ↓HDAC4, ↑HLA-DMA, ↑HLA-DMB, ↑HLA-DOA, ↑HLA-DQB1, ↑HLA-DRA, ↑HLA-DRB1, ↑HOXB4, ↓HP, ↑ICOSLG, ↑ID1, ↑IGHG1, ↑IGK@, ↑IL11RA, ↑IL21R, ↑IL23A, ↑IL27RA, ↑IL6ST, ↑IL7R, ↑ITK, ↑LCK, ↑LILRB1, ↑LYPD3, ↓MAPK14, ↑MARCO, ↓MMP9, ↑MSN, ↑NCR3, ↑NRG1 (includes EG:112400), ↑PANX1, ↑PLA2G7, ↑PLXNA1, ↑PNOC, ↑POU2AF1, ↑PTGIR, ↑RASGRP1, ↑RECK, ↑RORA, ↑S100A10, ↓S100A8, ↓S100A9, ↑S100B, ↑SERPINB9, ↑SERPINF1, ↑SH2D1B, ↑SKAP1, ↑SPON2, ↑STAT4, ↑TBXA2R, ↑TCL1A, ↑TNFRSF13C, ↑TNFRSF25, ↑TXK, ↑VIPR1, ↑ZAP70</p>	1,36E-12 - 1,23E-01	89

\*p-valor corrigido para múltiplo teste (Benjamini-Hochberg)

**APÊNDICE 12.** Lista dos 107 lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras pré-tratamento de responsivos e pós-tratamento de não responsivos ao IM.

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>*Tipo de Probe</b>	<b><sup>‡</sup>q-value</b>	<b><sup>§</sup>Fold Change</b>
23180	RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1	AS-PIN	0	4,73
5583	PRKCH	protein kinase C, ETA	S-TIN	0	4,51
8611	PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A	AS-TIN	0	4,15
51070	NOSIP	nitric oxide synthase interacting protein	AS-PIN	6,87	4,08
112597	MGC4677	hypothetical protein MGC4677	AS-TIN	4,51	3,89
596	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	S-TIN	3,02	3,73
3899	AFF3	AF4/FMR2 family, member 3	S-TIN	3,02	3,52
10664	CTCF	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)	AS-TIN	8,52	3,37
5829	PXN	Paxillin	AS-TIN	5,20	3,25
55619	DOCK10	dedicator of cytokinesis 10	S-TIN	2,23	3,16
213	ALB	Albumin	AS-PIN	0	3,10
116987	CENTG2	centaurin, gamma 2	AS-TIN	6,87	2,97
253827	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	AS-PIN	6,87	2,89
6487	ST3GAL3	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	S-TIN	8,52	2,87
11214	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	S-TIN	6,87	2,77
817	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	S-TIN	0	2,65
288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	S-TIN	4,51	2,54
54765	TRIM44	tripartite motif-containing 44	S-TIN	3,02	2,53

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>*Tipo de Probe</b>	<b>‡q-value</b>	<b>§Fold Change</b>
22926	ATF6	activating transcription factor 6	AS-TIN	5,28	2,50
84333	PCGF5	polycomb group ring finger 5	S-TIN	8,52	2,46
55617	TASP1	taspase, threonine aspartase, 1	AS-PIN	2,23	2,44
152789	JAKMIP1	janus kinase and microtubule interacting protein 1	AS-TIN	3,02	2,42
9159	PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	S-TIN	5,28	2,30
27347	STK39	serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)	S-TIN	4,51	2,29
115350	FCRL1	Fc receptor-like 1	S-TIN	2,23	2,29
9159	PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	S-TIN	2,23	2,26
55636	CHD7	chromodomain helicase DNA binding protein 7	AS-PIN	0	2,23
6599	SMARCC1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1	S-TIN	8,52	2,21
11030	RBPM5	RNA binding protein with multiple splicing	AS-PIN	8,52	2,20
4735	SEPT2	septin 2	AS-TIN	5,28	2,19
26751	SH3YL1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	S-TIN	4,51	2,17
64431	ACTR6	ARP6 actin-related protein 6 homolog (yeast)	S-TIN	2,23	2,16
972	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	AS-PIN	8,52	2,10
972	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	AS-PIN	8,52	2,10
2034	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	AS-TIN	0	2,09
57562	KIAA1377	KIAA1377	S-TIN	2,23	2,08
23484	LEPROTL1	leptin receptor overlapping transcript-like 1	AS-PIN	5,20	2,08
28514	DLL1	delta-like 1 ( <i>Drosophila</i> )	AS-PIN	5,28	2,06
158158	RASEF	RAS and EF-hand domain containing	S-TIN	6,87	2,06
170463	SSBP4	single stranded DNA binding protein 4	S-TIN	9,39	2,06

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>*Tipo de Probe</b>	<b>‡q-value</b>	<b>§Fold Change</b>
11010	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	AS-TIN	4,51	2,05
83636	C19orf12	chromosome 19 open reading frame 12	AS-TIN	0	1,97
81606	LBH	limb bud and heart development homolog (mouse)	S-TIN	3,02	1,97
5144	PDE4D	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 dunce homolog, Drosophila)	S-TIN	6,87	1,95
84236	RHBDD1	rhomboid domain containing 1	AS-TIN	9,39	1,95
11336	EXOC3	exocyst complex component 3	AS-PIN	8,52	1,90
64431	ACTR6	ARP6 actin-related protein 6 homolog (yeast)	S-TIN	8,52	1,89
4684	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	S-TIN	2,23	1,88
23199	KIAA0182	KIAA0182	S-TIN	0	1,87
9397	NMT2	N-myristoyltransferase 2	S-TIN	2,23	1,87
283383	GPR133	G protein-coupled receptor 133	AS-TIN	0	1,87
1660	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	S-TIN	9,39	1,87
960	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	AS-PIN	2,23	1,84
3956	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	AS-PIN	5,20	1,82
5046	PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	AS-TIN	5,28	1,82
55013	CCDC109B	coiled-coil domain containing 109B	AS-PIN	6,87	1,81
59343	SEN2	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2	AS-PIN	2,23	1,81
23019	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	AS-PIN	5,28	1,78
80144	FRAS1	Fraser syndrome 1	AS-TIN	0	1,77
11157	LSM6	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	S-TIN	5,20	1,77
7009	TEGT	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	S-TIN	4,51	1,77
11010	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	AS-TIN	2,23	1,76

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>*Tipo de Probe</b>	<b>‡q-value</b>	<b>§Fold Change</b>
9630	GNA14	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14	S-TIN	6,87	1,76
8120	AP3B2	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit	AS-PIN	8,52	1,74
64754	SMYD3	SET and MYND domain containing 3	AS-TIN	4,51	1,70
3708	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	S-TIN	4,51	1,70
51621	KLF13	Kruppel-like factor 13	S-TIN	4,51	1,69
11238	CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	AS-TIN	5,20	1,69
51706	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1	AS-TIN	4,51	1,68
29997	GLTSCR2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	AS-PIN	8,52	1,67
5682	PSMA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	S-TIN	5,28	1,67
30811	HUNK	hormonally upregulated Neu-associated kinase	S-TIN	3,02	1,65
960	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	AS-PIN	8,52	1,65
2971	GTF3A	general transcription factor IIIA	AS-PIN	5,28	1,64
10915	TCERG1	transcription elongation regulator 1	AS-PIN	0	1,64
57696	DDX55	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55	AS-PIN	8,52	1,60
84940	CORO6	coronin 6	AS-TIN	4,51	1,59
79789	CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	S-TIN	9,39	1,58
81	ACTN4	actinin, alpha 4	AS-TIN	2,23	1,58
23157	SEPT6	septin 6	AS-TIN	6,87	1,57
5146	PDE6C	phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	AS-TIN	0	1,57
868	CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	S-TIN	8,52	1,55
636	BICD1	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	S-TIN	6,87	1,55
79658	ARHGAP10	Rho GTPase activating protein 10	S-TIN	3,02	1,55

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>*Tipo de Probe</b>	<b>‡q-value</b>	<b>§Fold Change</b>
79158	GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits	AS-PIN	8,52	1,54
2034	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	AS-PIN	6,87	1,54
51642	MRPL48	mitochondrial ribosomal protein L48	AS-PIN	2,23	1,54
51669	TMEM66	transmembrane protein 66	AS-PIN	6,87	1,53
26112	CCDC69	coiled-coil domain containing 69	AS-PIN	9,39	1,53
718	C3	complement component 3	AS-TIN	0	1,53
5663	PSEN1	presenilin 1 (Alzheimer disease 3)	AS-PIN	6,87	1,52
92689	FAM114A1	family with sequence similarity 114, member A1	AS-PIN	2,23	1,52
4012	LNPEP	leucyl/cystinyl aminopeptidase	S-TIN	6,87	1,52
10460	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	S-TIN	2,23	1,51
9135	RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	S-TIN	3,02	1,51
23198	PSME4	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	AS-PIN	5,28	1,51
54622	ARL15	ADP-ribosylation factor-like 15	S-TIN	2,23	1,50
84324	CIP29	cytokine induced protein 29 kDa	AS-TIN	8,52	1,50
9535	GMFG	glia maturation factor, gamma	AS-PIN	5,28	-1,57
10745	PHTF1	putative homeodomain transcription factor 1	S-TIN	3,34	-2,06
10745	PHTF1	putative homeodomain transcription factor 1	S-TIN	5,28	-2,16
1432	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	S-TIN	3,34	-2,73
1432	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	S-TIN	5,28	-2,96
55284	UBE2W	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	S-TIN	3,34	-3,06
6279	S100A8	S100 calcium binding protein A8	AS-PIN	0	-4,77
2078	ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)	AS-TIN	5,28	-5,43

<b>ID gene hospedeiro</b>	<b>Símbolo do gene hospedeiro</b>	<b>Descrição do gene hospedeiro</b>	<b>*Tipo de Probe</b>	<b>‡<i>q-value</i></b>	<b>§<i>Fold Change</i></b>
10409	BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	S-TIN	0	-5,67

\* Tipo de probe: S-TIN, lncRNA totalmente intrônico senso; AS-TIN, lncRNA totalmente intrônico antisense; AS-PIN, lncRNA parcialmente intrônico antisense. ‡ *q-value* representa a taxa de falsa descoberta (FDR) para cada gene calculado pelo método SAM (Significance Analysis of Microarrays). § *Fold Change* é calculado como a razão da média dos valores de expressão dos não responsivos em relação aos responsivos. Sinais positivos e negativos correspondem, respectivamente, a transcritos hiperexpressos e hipoexpressos nos não responsivos em relação aos responsivos.