

Resistência ao Imatinib: da problemática às novas estratégias terapêuticas para a
Leucemia Mieloide Crónica

Sílvia Raquel Ferreira Fonseca

Resistência ao Imatinib: da problemática às novas estratégias terapêuticas para
a Leucemia Mieloide Crónica

Trabalho final com vista à atribuição do grau de Mestre no âmbito do Mestrado em
Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor Sérgio Paulo Simões

Professor Doutor João Nuno Moreira

Janeiro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica é uma neoplasia mieloproliferativa resultante da expressão da tirosina cinase bcr-abl. O Imatinib foi o primeiro inibidor de tirosina cinase utilizado na prática clínica e rapidamente se tornou a primeira linha de tratamento para LMC. No entanto, mais de 30% dos doentes adquire resistência ao fármaco, tornando-se fundamental identificar as suas causas, bem como desenhar estratégias que consigam ultrapassar os vários mecanismos de resistência descritos até então.

Atualmente existe uma panóplia de estudos científicos que abordam este tema e já existem muitas estratégias que visam ultrapassar a resistência ao Imatinib em fase de investigação clínica. Espera-se que no futuro próximo algumas destas estratégias possam desempenhar um papel relevante na prática clínica.

Este trabalho visa fazer o levantamento do estado da arte das estratégias que se encontram a ser desenvolvidas no âmbito do combate da resistência ao IM, nomeadamente estratégias de silenciamento do mRNA de bcr-abl, desenvolvimento de vacinas, de novos fármacos, associações de fármacos, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos para a LMC presentes nas diversas vias de sinalização ativadas pela oncoproteína bcr-abl. Pretende-se efetuar uma revisão destas estratégias, bem como apontar algumas perspectivas futuras de evolução nesta área.

Palavras Chave: Leucemia Mielóide Crônica, BCR-ABL, resistência ao Imatinib, novas estratégias terapêuticas, siRNA

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia is a myeloproliferative neoplasm that results from bcr-abl tyrosine kinase expression. Imatinib was the first tyrosine kinase inhibitor used in clinical practice and quickly became a first-line treatment for CML. However, over 30% of patients acquire drug resistance, becoming critical to identify its causes, as well as designing strategies that can overcome the multiple resistance mechanisms described so far.

Currently there is a plethora of scientific studies that address this issue and there are many strategies to overcome Imatinib resistance undergoing clinical investigation. In the near future it is expected that some of these strategies may play an important role in clinical practice.

This work aims to survey the state of the strategies that are being developed in order to combat resistance to IM, including strategies of silencing mRNA bcr-abl, vaccines

development, new drugs, drugs combination, as well as identification of new CML therapeutic targets existing in several signaling pathways activated by bcr-abl oncoprotein. The purpose is making a revision of these strategies, as well as indicates some future perspectives of evolution in this area.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, BCR-ABL, Imatinib resistance, new therapeutic strategies, siRNA

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB1 – *Adenosine Triphosphate – binding cassette transporter*

AGPI – *α 1-acid glycoprotein – I*

asODN – *Oligonucleotídeos antisense (Antisense oligodeoxynucleotides)*

CB – *Crise Blástica*

CCR – *Resposta citogenética completa (Complete Citogenetic Response)*

CHR – *Resposta hematológica completa (Complete Hematologic Response)*

CMR – *Resposta molecular completa (Complete Molecular Response)*

FA – *Fase Acelerada*

FC – *Fase Crónica*

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HDACi – *Inibidor da Histona Desacetilase*

hOCT1 – *Human organic cation transporter type I*

I.R.I.S. – *International Randomized Study of Interferon versus ST1571*

IM – *Imatinib*

INF- α – *Interferon alpha*

K562 – *Linha celular resistente ao imatinib*

LMC – *Leucemia Mieloide Crónica*

LNA – *Locked nucleic acid*

M-bcr – *Major breakpoint cluster region*

m-bcr – *Minor breakpoint cluster region*

MDR1 – *Related Multiple Resistance Protein-1 – ABCB1*

PDGF-R – *Platelet-derived growth factor receptors*

P-gp – *P-glycoprotein (glicoproteína transmembranar)*

Ph – *Cromossoma Filadélfia (Philadelphia Chromosome)*

PI3K/AKT – *Phosphatidylinositol 3-kinase*

RAS – *Rat Sarcoma*

RISC – *RNA-induced silencing complex*

RNAi – *RNA interference (RNA interferência)*

ROS – *Reactive oxygen species*

RT-PCR – *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

siRNA – *Small interfering RNA*

TKI – *Inibidor da tirosina cinase*

WT1 – *Wilms tumor protein WT-1*

μ -bcr – *Micro breakpoint cluster region*

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	2
1.1 Cromossoma de Philadelphia	3
1.2 Proteína quimérica bcr-abl	4
1.3 Vias de sinalização alteradas pela bcr-abl	7
1.4 Expressão de bcr-abl e instabilidade genómica	10
2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	12
2.1 Imatinib	15
3. RESISTÊNCIA AO IMATINIB	19
3.1 Mutações no domínio tirosina cinase da proteína bcr-abl	20
3.2 Aumento da expressão da proteína bcr-abl	22
3.3 Alteração da expressão de proteínas transmembranares de efluxo e influxo	23
3.4 Alterações na regulação de mecanismos de transdução de sinal	25
3.5 Evolução Clonal	26
4. ESTRATÉGIAS PARA ULTRAPASSAR A RESISTÊNCIA AO IMATINIB.....	28
4.1 TKI's de segunda e terceiras gerações	28
4.1.1 TKI's de segunda geração	28
4.1.2 TKI's de terceira geração	29
4.2 Terapêutica combinada	32
4.3 Estratégias que envolvem o ajuste da concentração plasmática de IM	36
4.4 Estratégias envolvidas na destabilização da proteína bcr-abl	38
4.5 Estratégias de silenciamento do mRNA da bcr-abl.....	40
4.5.1 Oligonucleotídeos <i>Antisense</i>	41
4.5.2 Ribozimas	43
4.5.3 RNA interferência	44
4.6 Estratégias para o bloqueio da oligomerização de <i>BCR-ABL</i>	47
5. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA A LMC.....	48
5.1 Vias de sinalização ativadas pela oncoproteína bcr-abl que podem constituir alvos terapêuticos para a LMC.....	48
5.2 Desenvolvimento de vacinas para a LMC	51
CONCLUSÃO	54
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa que resulta da expressão da tirosina cinase bcr-abl. O uso do inibidor Imatinib (IM) veio alterar significativamente a sobrevida dos doentes, sendo o fármaco estabelecido como primeira linha de tratamento na LMC. No entanto, muitos dos doentes adquirem resistência ao fármaco, tornando-se fundamental identificar as suas causas, bem como definir estratégias que tentem ultrapassar essa resistência.

O número elevado de publicações científicas desenvolvidas nesta área tem revelado a crescente importância desta problemática na comunidade científica, bem como a vontade de ultrapassar esta resistência recorrendo ao desenvolvimento de diferentes tipos de estratégias no campo da biotecnologia farmacêutica.

Este trabalho visa fazer o levantamento do estado da arte das estratégias que se encontram a ser desenvolvidas no âmbito do combate da resistência ao IM, nomeadamente estratégias de silenciamento do mRNA de bcr-abl, desenvolvimento de vacinas, de novos fármacos, associações de fármacos, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos para a LMC presentes nas diversas vias de sinalização ativadas pela oncoproteína bcr-abl. Pretende-se efetuar uma compilação destas estratégias, bem como apontar algumas perspectivas futuras de evolução nesta área.

Para isso, proceder-se-á a uma revisão bibliográfica teórica atualizada da literatura através de um processo sequencial que envolve: a compilação, análise, avaliação crítica da informação disponível e sistematização da mesma sob a forma deste trabalho.

O presente trabalho encontra-se dividido em cinco secções. Na primeira está contemplada uma breve introdução à patologia, na segunda secção uma abordagem ao tratamento farmacológico disponível atualmente para a mesma. Na terceira secção são apresentados os vários mecanismos de resistência ao IM e na secção seguinte (quarta secção) as diferentes estratégias para ultrapassar essa resistência. Na quinta e última secção são contempladas as possíveis novas abordagens terapêuticas para a LMC que já se encontram em fase de ensaio clínico e, como tal, muito próximas de alcançar o mercado tentando ser uma mais-valia no tratamento desta patologia.

I. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

A Leucemia Mieloide Crónica (LMC) é uma doença clonal mieloproliferativa que tem origem nas células estaminais hematopoiéticas pluripotenciais. (1) A incidência da LMC na maioria dos países ocidentais é cerca de 1,5 por 100 000 habitantes por ano, 4500 novos casos por ano são diagnosticados nos E.U.A. É ligeiramente mais frequente em homens que em mulheres (1,4 a 2,2:1), sendo rara em crianças. A idade média de aparecimento da doença é cerca de 50 anos, verificando-se um crescimento progressivo da incidência da doença com o aumento da idade. Este tipo de leucemia representa 15% das leucemias do adulto. (2)

A LMC foi descrita pela primeira vez em 1845 por Bennet, Craigie e Virchow. (3) Mais de 90% dos casos de LMC estão associados à presença do cromossoma de Philadelphia (Ph), sendo a primeira doença maligna a ser associada a uma mutação cromossómica adquirida. (4)

A doença desenvolve-se caracteristicamente em três fases distintas que se sucedem. A Fase Crónica (FC), a primeira fase que quando não tratada tem uma duração média de 3 a 6 anos; a Fase Acelerada (FA), para a qual a doença progride inevitavelmente culminando na Crise Blástica (CB), terceira e última fase da doença.

Cerca de 90% dos casos de LMC são diagnosticados na Fase Crónica da doença, que é caracterizada por um aumento do número de leucócitos e/ou plaquetas e pelo aparecimento de blastos indiferenciados na medula óssea, (que representam menos de 10% das células). O diagnóstico da doença nesta fase resulta ocasionalmente, da observação das análises hematológicas de rotina, onde se verifica um aumento da contagem de glóbulos brancos. Trata-se de uma fase quase assintomática ou com sintomas inespecíficos como perda de peso, fadiga, anemia, sangramentos inespecíficos, suores, desconforto abdominal, entre outros.

A Fase Acelerada, uma fase de transição que pode durar de semanas a alguns meses, caracterizada pelo surgimento de sintomas progressivamente mais graves, como esplenomegália e trombocitopenia. Nesta fase ocorre um aumento do número de blastos indiferenciados, representando cerca de 10% a 30% das células.

Por último a Crise Blástica, cujo fenótipo é muito semelhante ao da Leucemia Mieloide Aguda e o tempo médio de sobrevivência é cerca de 2 a 4 meses, caracteriza-se pela presença de blastos indiferenciados (mais de 30% das células do sangue e medula óssea)

que podem formar tumores na pele, osso e gânglios linfáticos. A doença culmina nesta fase, onde se verifica um aumento da gravidade de toda a sintomatologia. (5)

1.1 Cromossoma de Philadelphia

Em 1960 Nowell e Hungerford descobriram o Ph, estabelecendo a primeira relação entre uma mutação cromossômica específica e uma neoplasia. (6) Deste modo, a LMC tornou-se um modelo de estudo para o cancro, sendo esta descoberta impulsionadora para a identificação e associação de muitas aberrações cromossômicas com neoplasias. (7)

O Ph é considerado o marcador citogenético da LMC, uma vez que se encontra presente em cerca de 90% dos doentes com esta patologia. (8) Inicialmente Nowell e Hungerford associaram esta anomalia cromossômica a uma simples deleção. Em 1973, Rowley através do uso de novas técnicas de citogenética, nomeadamente, a marcação com quinacrina fluorescente demonstrou que este cromossoma resulta de uma translocação recíproca entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22 $t(9;22)(q34;q11)$ (Figura 1). (9) Permanece ainda desconhecido o mecanismo que despoleta esta translocação que resulta da justaposição da sequência 3' do proto-oncogene-*ABL* ("Abelson") do cromossoma 9 com a sequência 5' do gene *BCR* ("Breakpoint Cluster Region") do cromossoma 22. Da expressão do gene resulta a proteína quimérica *bcr-abl* com atividade tirosina cinase constitutiva. (10)

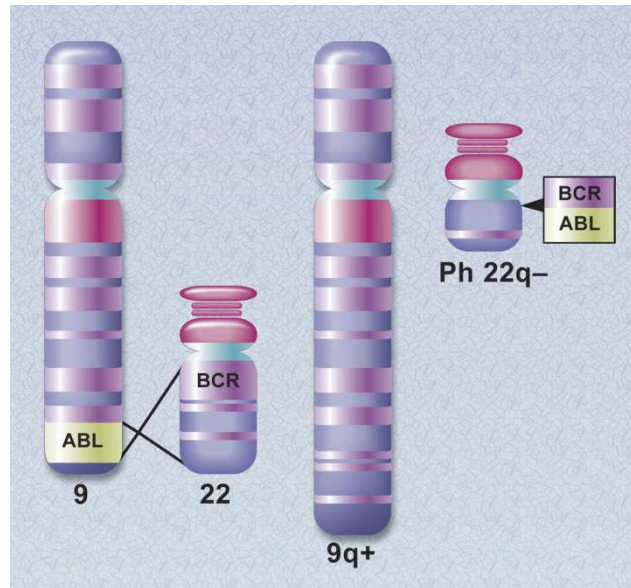


Figura 1: Formação do cromossoma de Philadelphia em resultado da translocação recíproca entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22 $t(9;22) (q34;q11)$. Adaptado de (9)

1.2. Proteína quimérica bcr-abl

A LMC é uma neoplasia incomum, na qual o produto de um único oncogene tem o papel central na transformação maligna da sua patologia. A proteína quimérica bcr-abl está presente em quase todos os casos desta patologia, sendo considerada “the hallmark” da LMC. (11) O fenótipo patológico característico da LMC é a expansão desregulada da linhagem mieloide, no entanto estudos citogenéticos demonstram que doentes em Crise Blástica apresentam também um fenótipo linfoblástico. (10)

O papel essencial da proteína quimérica bcr-abl nesta patologia tem sido demonstrado em vários trabalhos experimentais com diferentes modelos, nomeadamente num estudo realizado em ratinhos transplantados com células hematopoiéticas que expressavam esta proteína quimérica e que desenvolveram uma síndrome mieloproliferativa (com características semelhantes à LMC Fase Crónica). Verificou-se que quando expressavam uma isoforma inativa da cinase bcr-abl que continha uma mutação no domínio de ligação ao ATP, não desenvolviam a patologia. Assim, foi possível estabelecer a relação entre a atividade da tirosina cinase da proteína de fusão com o desencadear desta patologia. (12)

O gene *ABL* é o homólogo humano do oncogene *V-ABL* do vírus Abelson da leucemia murina (*A-MuLV*), com 230kb de comprimento, 11 exões e dois locais para “splicing”, ou seja os exões 1a e 1b. (11) Este gene codifica uma proteína com atividade de tirosina cinase envolvida em vários mecanismos de regulação da homeostase celular, nomeadamente na regulação do ciclo celular, na resposta ao stress genotóxico e diferenciação celular. De uma forma geral a proteína *abl* possui um papel complexo na modulação celular, integrando sinais extracelulares e intracelulares que influenciam o ciclo celular e a apoptose. Os pontos de quebra no gene *ABL* podem ocorrer na extremidade 5' a montante do primeiro exão alternativo 1b, a jusante do segundo exão alternativo 1a ou, mais frequentemente entre os dois exões. Após o “splicing” do transcrito primário os exões que serão ligados à sequência *BCR* são o a2, na maior parte dos casos, ou o a3 (Figura 2, A).

Consoante os pontos de quebra dos genes *ABL* e *BCR*, a proteína *bcr-abl* pode estar associada a diferentes formas de leucemia e ter diferentes pesos moleculares. (13)

As funções fisiológicas desempenhadas pela proteína resultante do gene *BCR* ainda não se encontram muito bem definidas, sabendo-se, no entanto, que possui uma atividade serina/treonina cinase. (8) Os pontos de quebra no gene *BCR* podem ocorrer em três regiões principais bem definidas: M-bcr (“major breakpoint cluster region”), m-bcr (“minor breakpoint cluster region”) e μ -bcr (“micro breakpoint cluster region”) (Figura 2,A). O tipo de transcrito *BCR-ABL* é determinado pelo ponto de quebra no gene *BCR*. M-bcr é o ponto de quebra mais comum no gene *BCR*, localizado entre os exões 12 e 16 (também conhecidos b1 e b5). Quando a quebra ocorre na M-bcr, a sequência do transcrito *BCR-ABL* resultante pode ser b2a2 ou b3a2 (resultado do “splicing” alternativo). Estes transcritos são traduzidos na proteína quimérica *bcr-abl* com peso molecular 210kDa, a mais comum nos casos típicos de LMC. (13) Quando o ponto de quebra ocorre na m-bcr o transcrito *BCR-ABL* resultante é E1a2, que é traduzido na proteína quimérica *bcr-abl* com peso molecular mais baixo 190kDa (comum na Leucemia Linfoblástica Aguda Ph⁺). Na μ -bcr, o ponto de quebra ocorre nos exões 19 e 20 resultando a sequência do transcrito *BCR-ABL* e19a2, que é traduzida na proteína quimérica com peso molecular 230kDa (Figura 2,B). (14)

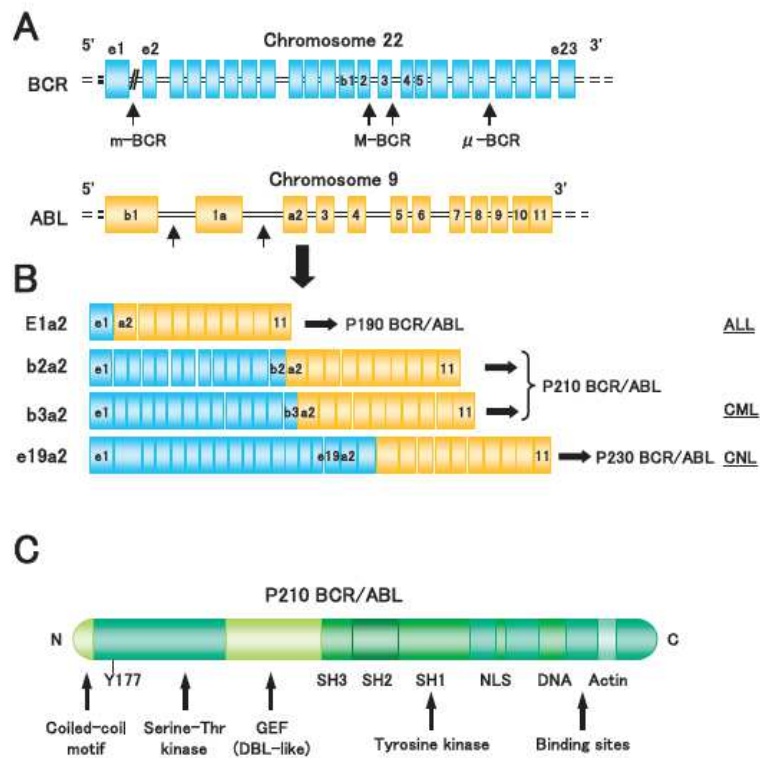


Figura 2: Formação do oncogene quimérico *BCR-ABL* pela translocação $t(9q;22q)$. Em A são ilustrados os pontos de quebra dentro do gene *BCR* e do gene *ABL*. Em B encontram-se representados os transcritos de fusão resultantes da translocação $t(9;22)$ ($q34;q11$) que dão origem aos diferentes fenótipos de LMC. Em C a esquematização dos domínios das proteínas *bcr* e *abl*. Adaptado de (13)

O gene *BCR-ABL* que resulta da justaposição dos dois genes acima descritos é composto por diversos domínios estruturais (Figura 2C). O domínio SH1 (“SRC-homology I”) da porção *ABL* da proteína corresponde ao domínio tirosina cinase responsável pela transformação neoplásica da LMC. (14) Os domínios SH2 e SH3 encontram-se envolvidos nas interações proteína-proteína, que regulam a atividade da tirosina-cinase e na modulação da ativação das vias de transdução de sinal. (11) O domínio SH3 regula esta cinase mantendo-a constitutivamente inativa em condições fisiológicas. A fusão da sequência *BCR* com a sequência *ABL* interfere com a estrutura deste domínio, resultando na ativação constitutiva da proteína quimérica *bcr-abl*. O domínio SH2 da proteína *abl* também desempenha um papel importante na transformação neoplásica, uma vez que, alterações na integridade funcional deste domínio resultam numa menor afinidade para a ligação às proteínas-alvo da tirosina cinase, conseqüentemente reduzindo a capacidade transformante da proteína *bcr-abl*. (8)

Alguns domínios contidos na porção bcr da proteína quimérica bcr-abl são essenciais para a ligação de proteínas adaptadoras tais como: grb2 (“growth factor recetor-bound protein2”), crkl (“CRK-oncogene-like-protein”) e shc (“SRC homology 2-containing protein”), que são também substrato de bcr-abl. A autofosforilação de bcr-abl em Tyr177 (resíduo de tirosina 177 da porção bcr) é necessária para a ligação das proteínas adaptadoras grb2 e crkl essenciais para a transformação oncogénica hematopoiética. Tal como referido posteriormente, estes são alvos moleculares para novas estratégias terapêuticas para a LMC.

Uma vez identificada a atividade constitutiva da tirosina cinase bcr-abl como o mecanismo etiológico da LMC, vários estudos têm sido realizados para identificar quer os substratos desta tirosina cinase, bem como as inúmeras vias de transdução de sinal em que esta interfere. (15)

1.3 Vias de sinalização alteradas pela bcr-abl

A atividade constitutiva da proteína bcr-abl altera, direta ou indiretamente, a regulação fisiológica de inúmeras proteínas envolvidas nos mecanismos de sinalização celular, promovendo alterações nas vias de transdução de sinal que influenciam o crescimento e a sobrevivência das células hematopoiéticas. (16)

As moléculas-alvo da proteína cinase bcr-abl incluem membros das principais vias de sinalização: a via RAS (“Rat Sarcoma”), a via PI3K/AKT (“Phosphatidylinositol-3 kinase”) e a via JAK/STAT (“Janus kinase-signal transducer and activator of transcription”) que regulam a proliferação celular e a apoptose. (5) Estas vias de sinalização são ativadas por sinais extracelulares (citocinas, fatores de crescimento e fatores de stress celular) que, através da integração de sinais regulam a sobrevivência, crescimento e diferenciação das células hematopoiéticas normais (Figura 3). A falta de regulação nestas vias irá traduzir-se num aumento da proliferação de formas indiferenciadas das células da linhagem mieloide, perda da capacidade de adesão destas células na medula óssea, bem como no aumento da capacidade de sobrevivência das mesmas (diminuição do processo apoptótico). (17)

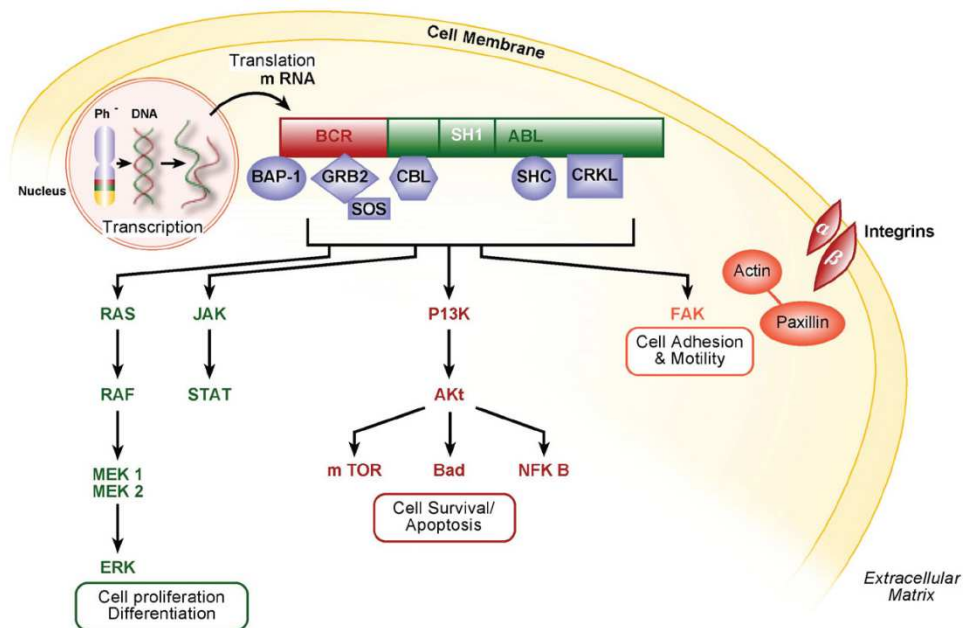


Figura 3: Esquematisação simplificada das principais vias de sinalização desreguladas pela atividade constitutiva da tirosina cinase bcr-abl. A proteína bcr-abl altera direta ou indiretamente a regulação fisiológica de inúmeras proteínas envolvidas nos mecanismos de sinalização celular, promovendo alterações nas vias de sinalização que influenciam o crescimento e a sobrevivência das células hematopoiéticas. As moléculas-alvo da proteína cinase bcr-abl incluem membros das principais vias de sinalização ilustradas na figura: a via RAS/MAP cinases, a via PI3K/AKT e a via JAK/STAT que regulam a proliferação celular e a apoptose. Adaptado de (10)

A via de sinalização RAS está envolvida na proliferação celular através da regulação da atividade de várias proteínas reguladoras do ciclo celular, bem como de alguns fatores de transcrição. Esta via de sinalização está também envolvida na regulação da diferenciação celular e da apoptose. A família das proteínas ras está localizada na superfície interna da membrana plasmática e exerce uma função importante em várias vias de sinalização mediadas por recetores de tirosina cinase e outros recetores. É uma via de sinalização absolutamente necessária para a transformação mediada pela proteína bcr-abl, que medeia a transmissão de sinais dos recetores da superfície membranar para os fatores de transcrição presentes no núcleo. Em células hematopoiéticas (com expressão da proteína quimérica bcr-abl), foi possível estabelecer uma relação entre a atividade de tirosina cinase desta proteína e a ativação constitutiva da glicoproteína ras, uma vez que inúmeros substratos desta proteína, como grb2, shc, crkl (moléculas adaptadoras) ativam ras. (18) A ativação constitutiva de ras em células leucémicas ativa a cascata das MAP cinases, o que resulta na desregulação de fatores de transcrição envolvidos na proliferação, crescimento e diferenciação celular. (19)

As oncoproteínas usam vários mecanismos moleculares para tornarem uma célula fenotipicamente anormal, com a vantagem de rápido crescimento. No caso de bcr-abl, a ativação constitutiva da via de sinalização PI3K/AKT é fundamental para esse efeito. Assim, esta é uma via de sinalização que se encontra envolvida no processo mitótico bem como na sobrevivência celular. Em células normais, PI3K é ativada pela formação de complexos mediados por proteínas adaptadoras ativadas (por exemplo gab2), que são um substrato direto para a proteína bcr-abl. A ativação constitutiva destas proteínas resulta na ativação constitutiva de PI3K. Em células leucémicas, a sobreativação desta via de sinalização resulta na inibição de moléculas envolvidas na sinalização pró-apoptótica e no aumento da ativação de proteínas envolvidas na via de sinalização antiapoptótica. O exemplo mais descrito é a fosforilação da proteína bad, pela cinase akt, que desta forma fica inativa. (19)

Na via de sinalização PI3K/AKT, os fosfolípidos formados por ação da pi3k irão agir sobre akt. A akt regula os mecanismos anti-apoptóticos fosforilando diretamente proteínas de morte celular, como por exemplo bad e caspase9. bad, bax e bid são proteínas pró-apoptóticas enquanto que, bcl2 e bcl-xl são proteínas antiapoptóticas. Quando bad é fosforilada, não há inibição de bcl2. Assim, a ativação constitutiva de bad anula a sua capacidade de causar morte celular. Além do mecanismo mediado por bad, akt também fosforila a caspase9, responsável pelo início do desencadeamento da cascata das caspases. A fosforilação da caspase9 também impede a liberação do citocromo C e como tal a apoptose. (20)

A via de sinalização JAK/STAT é conhecida por ser regulada através da ativação de recetores de citocinas ou fatores de crescimento. As proteínas stats, uma vez ativadas migram para o núcleo onde induzem alterações no padrão de expressão génica. Esta via de sinalização está envolvida na regulação da proliferação, divisão e sobrevivência das células hematopoiéticas, tendo sido demonstrado em patologias mieloides, que as proteínas da família stat estão envolvidas principalmente na inibição da apoptose e na suspensão da maturação celular. (15)

A família stat é composta por 7 membros: stat1, stat2, stat3, stat4, stat5a, stat5b e stat6. Estudos experimentais têm evidenciado que a oncoproteína bcr-abl ativa predominantemente stat5. Uma vez que stat5 é um substrato direto da proteína quimérica bcr-abl, a atividade constitutiva desta proteína resulta na ativação constante deste fator de transcrição. A ativação da proteína stat5 contribui para o aumento da expressão dos membros da família das proteínas antiapoptóticas bcl2, mcl-1 e bclxl, bem como no aumento da expressão de ciclina d1, molécula com uma função importante no ciclo celular (G1-Fase

S). A ativação constante do fator de transcrição stat5 nas células leucémicas tem como consequência mais relevante (e até então mais vezes descrita) a sobre-expressão do gene anti-apoptótico *BCL-XL*.

As proteínas stats são fisiologicamente fosforiladas por jak (“Janus Kinases”) que atuam na via de sinalização de recetores de fatores de crescimento. No entanto, em células leucémicas pensa-se que a fosforilação de stat é também mediada por cinases da família src, que se ligam aos domínios SH2 e SH3 da proteína quimérica bcr-abl. Assim, a proteína bcr-abl ativa stat5 independentemente de jak2. (15)

Em resumo, os sinais de sobrevivência iniciados por bcr-abl interferem criticamente com a hematopoiese normal. A presença da proteína de fusão tem resultado na ativação constitutiva de uma rede de vias de sobrevivência e tem contribuído para a transformação e resistência à apoptose. De referir que, uma vez que estas vias de sinalização podem ser ativadas por sinais extracelulares, o papel do microambiente da medula óssea (que contém citoquinas e matrizes extracelulares) na mediação da resistência a inibidores de bcr-abl é uma área ativa de investigação. Por exemplo, a secreção autócrina de GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating fator”) resulta na ativação de bcr-abl independente de stat5 e resistência a inibidores de bcr-abl. (15)

1.4 Expressão de bcr-abl e instabilidade genómica

A instabilidade genómica normalmente tem origem na resposta celular “aberrante” que resulta do aumento das lesões no DNA. (21) Nas células leucémicas, estes mecanismos podem ser dependentes ou independentes de bcr-abl. Os mecanismos para o reconhecimento e reparação de DNA encontram-se comprometidos nas células leucémicas. Tem sido demonstrado que bcr-abl induz mutações em genes responsáveis pela integridade genómica que funcionam como amplificadores de um fenótipo geneticamente instável. Tal poderia explicar a ocorrência das anormalidades cromossómicas não aleatórias que caracterizam a progressão da LMC. (2)

Observações clínicas têm mostrado que a atividade constitutiva da proteína bcr-abl pode induzir instabilidade genómica, levando a translocações cromossómicas, deleções, adição de cromossomas, ampliações de genes e mutações. Em células normais, os mecanismos de reparação do DNA são fortemente regulados, encontrando-se em equilíbrio com as vias apoptóticas, o que já não se verifica nas células leucémicas. As lesões no DNA, que contribuem para a instabilidade genómica, podem ocorrer devido a erros na replicação

e/ou devido à acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e devido a fatores externos, como por exemplo agentes genotóxicos. (22)

Tem sido demonstrada uma relação direta entre a atividade constitutiva da proteína bcr-abl e o aumento da produção endógena de ROS. Em células leucémicas, este aumento resulta no aumento do número de lesões no DNA (instabilidade genómica).

O funcionamento adequado dos mecanismos de reparação de DNA é imprescindível para a manutenção da homeostase celular. Assim sendo, alterações nestas vias levam à acumulação de mutações no DNA que poderão ativar oncogenes e vias alternativas de sinalização celular ou inativar genes supressores tumorais. Em células com expressão de bcr-abl há uma sobreativação de vias de reparação de DNA em consequência da interação da cinase bcr-abl com moléculas essenciais ao reconhecimento e reparação das lesões. Esta instabilidade pode também explicar a progressão da doença da Fase Crónica até à Crise Blástica. (2)

Um novo fenótipo patológico pode ser conferido à doença, resultando da acumulação de alterações genéticas ou epigenéticas em genes críticos que regulam as vias de sinalização das células e da desregulação de diversas vias de sinalização resultantes da atividade constitutiva da proteína bcr-abl. (22)

2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Um tratamento eficaz para a LMC baseia-se na obtenção simultânea de Resposta Molecular Completa (CMR - “Complete Molecular Response”), Resposta Hematológica Completa (CHR – “Complete Hematologic Response”) e Resposta Citogenética Completa (CCR – “Complete Cytogenetic Response”). A Resposta Molecular Completa ocorre quando se verifica ausência de transcritos *BCR-ABL* detetados por RT-PCR (“Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction”). A Resposta Hematológica Completa é definida pela normalização do hemograma. A contagem de células sanguíneas atinge portanto os valores normais, o que leva ao desaparecimento dos sintomas e sinais da doença. A Resposta Citogenética Completa é alcançada quando se verifica a erradicação das células da medula óssea que contêm o cromossoma Ph. Nenhum Ph+ em metafase é detetado por citogenética convencional (Tabela 1).

Através da monitorização de doentes com LMC foi possível estabelecer uma relação direta entre a resposta citogenética e o aumento da sobrevivência de doentes. Deste modo, o principal objetivo para estes doentes é atingir este tipo de resposta. (23)

Tabela 1. Definição do tipo de resposta e monitorização da LMC.

	(RH) Resposta Hematológica	(CyR) Resposta Citogenética	(RM) Resposta Molecular
Definição de Resposta	Completa (CHR): plaquetas <450 x 10 ⁹ /L; contagem de leucócitos <10x10 ⁹ /L; diferencial sem granulócitos imaturos e <5% basófilos; baço não palpável	Completa (CCyR): Ph+0% Parcial (PCyR): Ph+ 1%-35% Minor: Ph+36%-65% Minimal: Ph+66%-95% None: Ph+>95% Major: PCyR + CCyR	Completa: transcrições não quantificáveis e indetetáveis Major: 0.1%
Frequência de Monitorização	A cada 2 semanas, até que uma resposta completa seja alcançada e confirmada A cada 3 meses, salvo se for exigido	A cada 6 meses até que a resposta completa seja alcançada e confirmada Depois a cada 12 meses	A cada 3 meses
Métodos de Monitorização	Hemograma completo (CBC) com diferencial	Exame citogenético convencional FISH (apenas antes do tratamento)	RT-PCR

Adaptado de (23)

Desde a descoberta da LMC, têm vindo a ser desenvolvidas várias estratégias terapêuticas de eficácia crescente (Figura 4). (24)

O primeiro tratamento eficaz na LMC foi a solução de Fowler, muito utilizada no século XIX cujo princípio ativo era o arsénico. Recentemente estudos “*in vitro*” têm confirmado a atividade de compostos de arsénico contra as células leucémicas. O primeiro composto sintético com atividade na LMC foi o Busulfano, um agente alquilante, tendo sido depois introduzida a Hidroxiureia, com a vantagem de originar menos efeitos secundários que o Busulfano e a Citarabina, outro fármaco com atividade significativa na LMC. As terapêuticas disponíveis inicialmente para o tratamento da LMC tinham apenas um papel paliativo: induziam Resposta Hematológica Completa, aliviavam alguns sintomas, mas não se observava qualquer tipo de Resposta Citogenética Completa. Assim, estes fármacos, não alteravam o percurso natural da progressão da doença e proporcionavam apenas benefícios clínicos aos doentes. (5) (25)

O transplante alogénico de células estaminais continua a ser o tratamento mais efetivo na cura da LMC, embora vários esforços continuem a ser feitos no sentido de desenvolver novas estratégias terapêuticas. É o único tratamento capaz de erradicar a doença, uma vez que a grande maioria dos doentes atinge a Resposta Citogenética Completa. Contudo, este transplante precedido de mieloablação por quimioterapia ou radioterapia é uma intervenção invasiva com muitos riscos associados, estando disponível somente para uma pequena percentagem de doentes. (10)

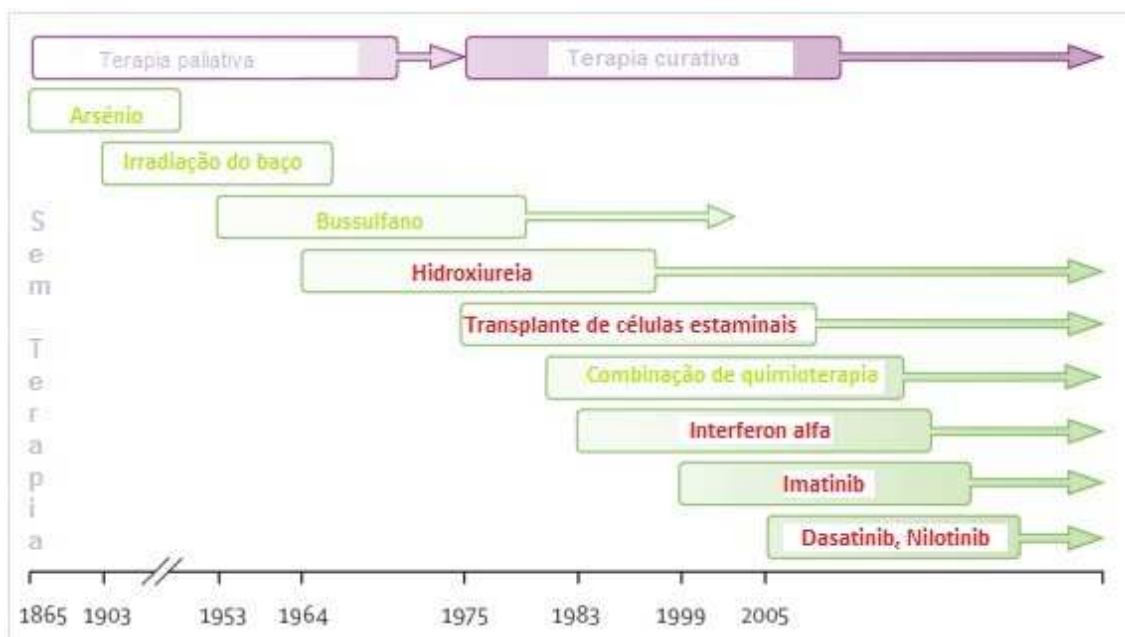


Figura 4 – Terapêuticas disponíveis ao longo do tempo para a LMC. Adaptado de (24)

No início da década de 1980 o Interferon alfa (INF- α), uma glicoproteína de origem biológica, com propriedades antiproliferativas e antivirais, foi introduzido no tratamento da LMC. O INF- α foi o primeiro agente terapêutico a induzir resposta citogenética em grande parte dos doentes com LMC submetidos a este tratamento. Deste modo foi possível aumentar o tempo de sobrevivência dos doentes e diminuir o nível da doença. No entanto uma elevada percentagem de doentes mostrou-se intolerante ao tratamento com INF- α devido aos seus elevados níveis de toxicidade. (26)

O início de uma nova fase no tratamento da LMC verificou-se com o desenvolvimento do inibidor da tirosina cinase, imatinib (IM) que representa um enorme sucesso como terapêutica dirigida, o que o tornou um tratamento de primeira linha para a LMC. Com este inibidor de tirosina cinase, é possível atingir taxas de resposta molecular, hematológica e citogenética até então nunca antes atingidas.

Atualmente já se encontram disponíveis na prática clínica inibidores da tirosina cinase de segunda geração: o Dasatinib (Bristol Myers Squibb) e o Nilotinib (Novartis). Estes têm uma mecanismo de ação semelhante ao do IM, contudo têm demonstrado ser moléculas mais potentes na inibição da tirosina cinase bcr-abl. (25)

A resposta transitória, ou mesmo inexistente dos doentes em Crise Blástica tem-se mantido inalterável em todas as formas de terapêutica utilizadas na LMC. Trata-se de uma

fase da doença em que a grande maioria dos doentes é refratária aos tratamentos atualmente disponíveis. (10)

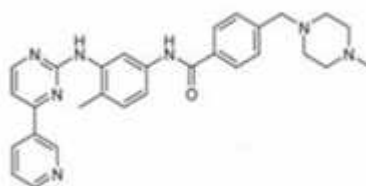
Seguidamente, descreve-se em mais detalhe as diferentes vertentes de aplicação da terapêutica com IM.

2.1 Imatinib

A proteína bcr-abl é um alvo ideal para o tratamento da LMC, uma vez que a identificação da sua atividade de proteína tirosina cinase, bem como a sua elevada expressão nas células leucémicas, estando ausente nas células normais, permite a eliminação seletiva das células neoplásicas. (10)

As proteínas tirosina cinases, são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP, para resíduos de tirosina (Tyr). Estas proteínas vão regular processos celulares como proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares. Deste modo justifica-se que alterações no mecanismo que regula as proteínas tirosina cinase tenha um papel importante no desencadear desta patologia maligna. (27)

O imatinib (IM), originalmente designado por “signal transduction inhibitor 571” (STI571), uma 2-fenil-amino-pirimidina (cuja estrutura química está representada na Figura 5), surgiu como o composto mais potente para inibir todas as formas de tirosina cinase bcr-abl. Este fármaco também inibe outras cinases preferencialmente as que estão relacionadas com c-kit e pdgf-r (“Platelet-derived growth factor receptors”). (14)



Imatinib (Gleevec)

Figura 5 – Estrutura química do Imatinib. Adaptado de (28)

O IM impede a ligação do ATP no domínio tirosina cinase da proteína bcr-abl, uma vez que a base do seu mecanismo de ação passa pela sua elevada afinidade de ligação ao local onde a molécula de ATP se liga na proteína bcr-abl. Ao impedir que a molécula de ATP

se ligue, estabiliza a proteína na sua conformação inativa (Figura 6). Deste modo, a tirosina cinase perde a capacidade de se autofosforilar, bem como de fosforilar os seus substratos, o que determina um bloqueio na sobreativação das vias de transdução de sinal alvo da oncoproteína bcr-abl.

O IM funciona assim como um inibidor competitivo da tirosina cinase bcr-abl levando à inibição da proliferação celular, restauração do controlo do ciclo celular, indução da apoptose, bem como à reversão da instabilidade genética em células dependentes de bcr-abl. (25)

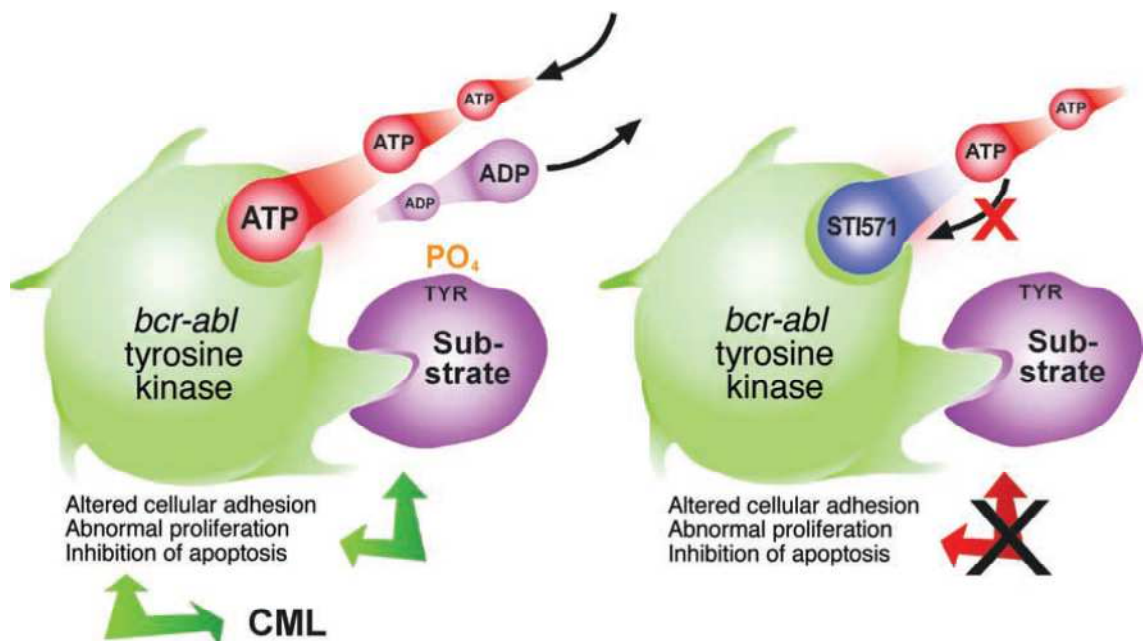


Figura 6 – Representação esquemática do mecanismo de ação do inibidor da tirosina cinase Imatinib (IM). A tirosina cinase bcr-abl é uma cinase constitutivamente ativa que funciona através da ligação da molécula de ATP ao domínio tirosina cinase de bcr-abl, através da transferência de um grupo fosfato de ATP, para resíduos de tirosina (Tyr), o que desencadeia um aumento da proliferação celular característico das células mieloides na LMC. O Imatinib (IM), impede a ligação do ATP no domínio tirosina cinase da proteína bcr-abl, uma vez que o seu mecanismo de ação passa pela elevada afinidade de ligação ao local onde a molécula de ATP se liga na proteína bcr-abl, estabilizando a proteína na sua conformação inativa, inibindo deste modo a sua atividade, o que determinará um bloqueio na sobreativação das vias de transdução de sinal alvo de bcr-abl. Adaptado de (27)

Os resultados obtidos com este TKI (inibidor da tirosina cinase), quer em modelos animais transplantados com células hematopoiéticas transformadas, bem como, em linhas celulares com expressão da proteína bcr-abl, indicaram uma grande eficácia do fármaco. Os

bons resultados pré-clínicos quer “in vitro”, quer “in vivo”, permitiram que o IM atingisse rapidamente a fase de ensaios clínicos. (8)

Em 1998 foi iniciada a Fase I dos ensaios clínicos nos Estados Unidos da América, um estudo que incluiu 83 doentes com LMC em fase crónica, intolerantes ou resistentes ao tratamento com INF- α . O IM foi administrado oralmente (25 a 1000mg /dia). A Resposta Hematológica Completa foi atingida em 53 dos 54 (98%) doentes tratados com IM 300mg/dia ou com uma dose superior. Dos 54 doentes, 29 atingiram resposta citogenética: 17 atingiram uma Resposta Citogenética Major (0-35% de células em metafase positivas para Ph) e 7 atingiram remissão citogenética completa. Esta foi uma fase onde apenas se registaram efeitos secundários mínimos, que não tornaram impeditivo a continuidade do tratamento, o que mostrou uma elevada eficácia do tratamento com IM.

A fase II dos ensaios clínicos foi realizada em 454 doentes em Fase Crónica tardia, sem resposta ao tratamento com INF- α , submetidos a 400mg/dia de IM por toma oral. 60% dos doentes atingiram Resposta Citogenética Major e 90% Resposta Hematológica Completa, existindo uma taxa de sobrevivência livre de progressão da doença de 89%. Um estudo realizado na fase II, com doentes em Fase Acelerada ou Crise Blástica que receberam doses de IM compreendidas entre 400mg/dia e 600mg/dia, demonstrou que 52% atingiram Resposta Hematológica Completa e 16 % uma Resposta Citogenética Major. Nestas fases da doença onde os doentes apresentam características refratárias, quando há resposta ao tratamento com IM esta será transitória e de curta duração.

Os resultados obtidos nestas duas fases foram impulsionadores de um ensaio randomizado que comparou a eficácia do tratamento com IM 400mg/dia e da combinação terapêutica INF- α /Citarabina em doses baixas, em doentes com LMC Fase Crónica inicial sem qualquer tratamento prévio. A fase III de ensaios clínicos, denominada I.R.I.S. (“International Randomized Study of Interferon Versus ST1571”) envolveu um estudo aleatório com 1106 doentes, 533 em cada braço. Ao fim de 19 meses, 87% dos doentes no grupo do IM atingiram Resposta Citogenética Major, contra os 35% do grupo tratado com INF- α e Citarabina. 76% dos doentes que receberam tratamento com IM atingiram resposta Citogenética Completa comparando com apenas 15% do outro grupo. O tratamento foi descontinuado ou cruzado com outro tratamento farmacológico alternativo em 15% dos doentes tratados com IM e em 89% dos doentes tratados com INF- α e Citarabina. É de salientar ainda, que as respostas no grupo de doentes sujeitos ao tratamento com IM foram atingidas muito mais rapidamente e que a taxa de progressão da doença para Crise Blástica foi bastante inferior neste grupo de doentes.

Os resultados obtidos nas fases de ensaio clínico demonstraram elevada eficácia do IM, sendo o fármaco introduzido na prática clínica e estabelecido como primeira linha de tratamento na LMC. A dose recomendada é 400mg/dia para doentes em Fase Crónica e 600mg/dia para doentes em Fase Acelerada ou Crise Blástica por toma oral. (8)

3. RESISTÊNCIA AO IMATINIB

Embora os resultados obtidos com o IM tenham sido bastante promissores, a existência de doentes resistentes a este fármaco tornou-se evidente logo depois da introdução do mesmo na prática clínica. Em doentes na fase avançada da doença que receberam IM, as respostas quer hematológica quer citogenética foram escassas ou de curta duração. Além disso, a presença de quantidades residuais de células que expressam *BCR-ABL* nos doentes que respondiam à terapêutica, mostrou que o IM não é uma terapia de cura, mas sim, um fármaco de supressão temporária da doença. (14)

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido direcionados à problemática da resistência ao IM e ajudado na compreensão dos elementos que contribuem para a sua ocorrência. Sendo o IM atualmente a primeira linha de terapia para a LMC, a resistência a este TKI tornou-se um problema expressivo e, como tal, o estudo, a compreensão e a caracterização dos mecanismos moleculares subjacentes a esta problemática tem-se verificado indispensável.

A resistência ao IM pode ser dividida em dois tipos: primária, também designada por refratária, na qual uma pequena percentagem de doentes é, à partida, resistente ao fármaco logo no início do tratamento e secundária, também conhecida por resistência adquirida, na qual após uma resposta inicial ao tratamento o doente adquire resistência ao fármaco depois de exposto ao mesmo durante um período de tempo. Estima-se que cerca de 20% a 30% de doentes acabará por desenvolver resistência ao IM. (29) (12)

Os mecanismos de resistência a este fármaco têm sido estudados em modelos laboratoriais quer “in vitro” quer “in vivo”, bem como diretamente em amostras de doentes resistentes ao IM. Pensa-se que a resistência ao IM, bem como a outros TKIs pode ser consequência da interação de múltiplos fatores como a adesão ao tratamento, biodisponibilidade do fármaco, farmacodinâmica, alterações genéticas, presença de mutações no domínio da proteína quimérica *bcr-abl*, ou combinações dos mesmos. (30) Múltiplos mecanismos podem estar na base dessa resistência. Atualmente muitos grupos de investigação empenham-se na interpretação destes mecanismos bem como, na resolução dos mesmos. De uma maneira resumida, os mecanismos de resistência podem ser divididos em dependentes ou independentes de *bcr.abl*. (12)

3.1 Mutações no domínio tirosina cinase da proteína bcr-abl

O desenvolvimento de mutações no domínio da tirosina cinase da proteína bcr-abl tem um papel fundamental na aquisição de resistência aos TKIs na LMC. A frequência das mutações nesta proteína cinase em doentes resistentes ao IM varia de 40% a 90%, aproximadamente, dependendo da definição de resistência, da metodologia de deteção, da fase da doença, entre outros fatores. (12)

Originalmente Schindler *et al* descreveram que o IM interage com o local de ligação do ATP da proteína cinase bcr-abl, na sua conformação inativa, o que se torna um potencial alvo para a resistência a este fármaco. (31) No seguimento destes estudos “*in vitro*” Gorre *et al* demonstraram, recorrendo a amostras de doentes resistentes ao IM, que em 9 doentes, 6 apresentavam substituição de um único nucleótido na posição 944 do gene *ABL*, que resultava na substituição de uma treonina por uma isoleucina no aminoácido 315 (Th³¹⁵→Ile³¹⁵; T315I). (32) Esta foi a primeira mutação descrita em doentes e que impede efetivamente a ligação do IM à proteína bcr-abl, sendo até hoje a única descrita que torna as células leucémicas insensíveis ao fármaco. Doentes tratados com TKIs de segunda geração, como o Nilotinib e o Dasatinib, que também apresentem esta mutação no gene *ABL* são insensíveis a estes fármacos. (33)

As mutações resultam portanto, da substituição de aminoácidos que impedem a ligação dita normal, do IM ao local de ligação do ATP. Inúmeras mutações adicionais têm sido caracterizadas no gene *ABL*, nomeadamente no local de ligação do ATP, no loop de ativação da cinase (A-loop), P-loop, domínio SH2, hélice C e no lobo terminal C. No entanto, as mutações fundamentais ocorrem em três regiões principais distintas no domínio da tirosina cinase do gene *BCR-ABL*: A-loop, no próprio domínio catalítico da cinase ou diretamente no local de ligação do ATP (P-loop), como ilustra a Figura 7. (34)

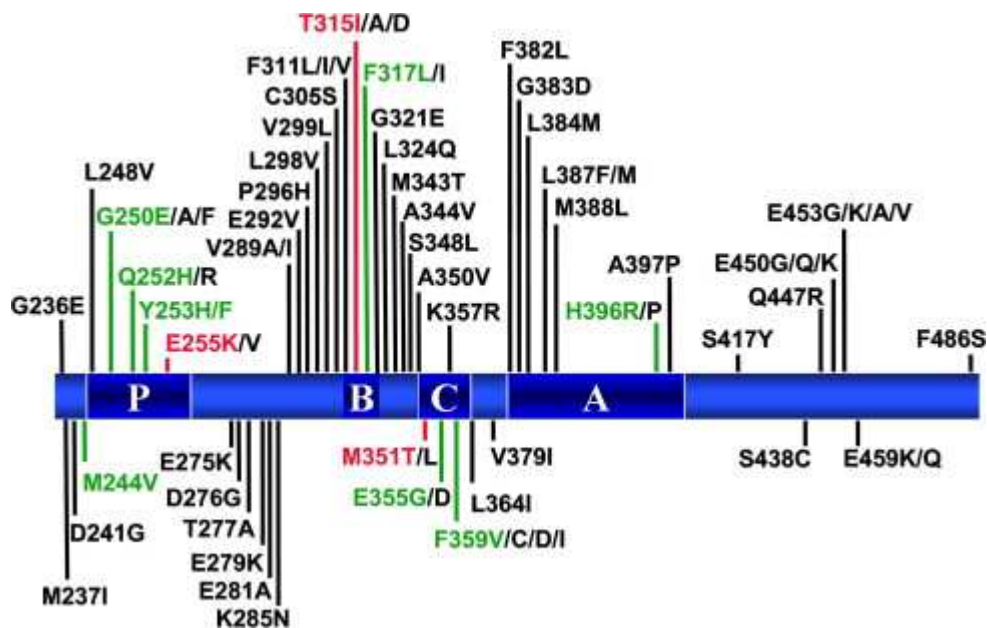


Figura 7 – Esquematização das principais mutações no domínio da tirosina cinase bcr-abl associadas à resistência clínica ao Imatinib (IM). (P) – P-loop; (B) – local de ligação do Imatinib (IM); (C) – domínio catalítico e (A) – A-loop. A vermelho encontram-se esquematizadas as mutações mais comuns (>10% de doentes apresentam estas mutações) e a verde as mutações apresentadas entre 2-10% de doentes. Adaptado de (34)

Embora o número de mutações pontuais continue a crescer, (como ilustra a Figura 8) o significado clínico das mesmas varia de indivíduo para indivíduo. (30) Níveis de resistência mais elevados são atingidos por mutações pontuais no P-loop (resíduos 244 a 255), que levam ao impedimento da ligação do IM à proteína mutada, uma vez que aminoácidos importantes para a ligação do IM são substituídos. No A-loop (resíduos 381 a 402), as mutações previnem a adoção da conformação inativa por parte da proteína cinase essencial à ligação do fármaco, conferindo níveis de resistência menos elevados. A consequente diminuição da sensibilidade ao IM pode por vezes ser ultrapassada com o aumento da dose do fármaco. (33)

O perfil mutacional é dinâmico, podendo existir num mesmo doente mais do que uma mutação, variando os clones resultantes de cada mutação, ao longo do tempo. Muitas mutações pontuais já existem antes do início da terapêutica com o IM. Consequentemente, o fármaco pode atuar como um mecanismo de seleção dos clones insensíveis ao tratamento, que por expansão clonal levam à ineficácia do tratamento com IM. (30)

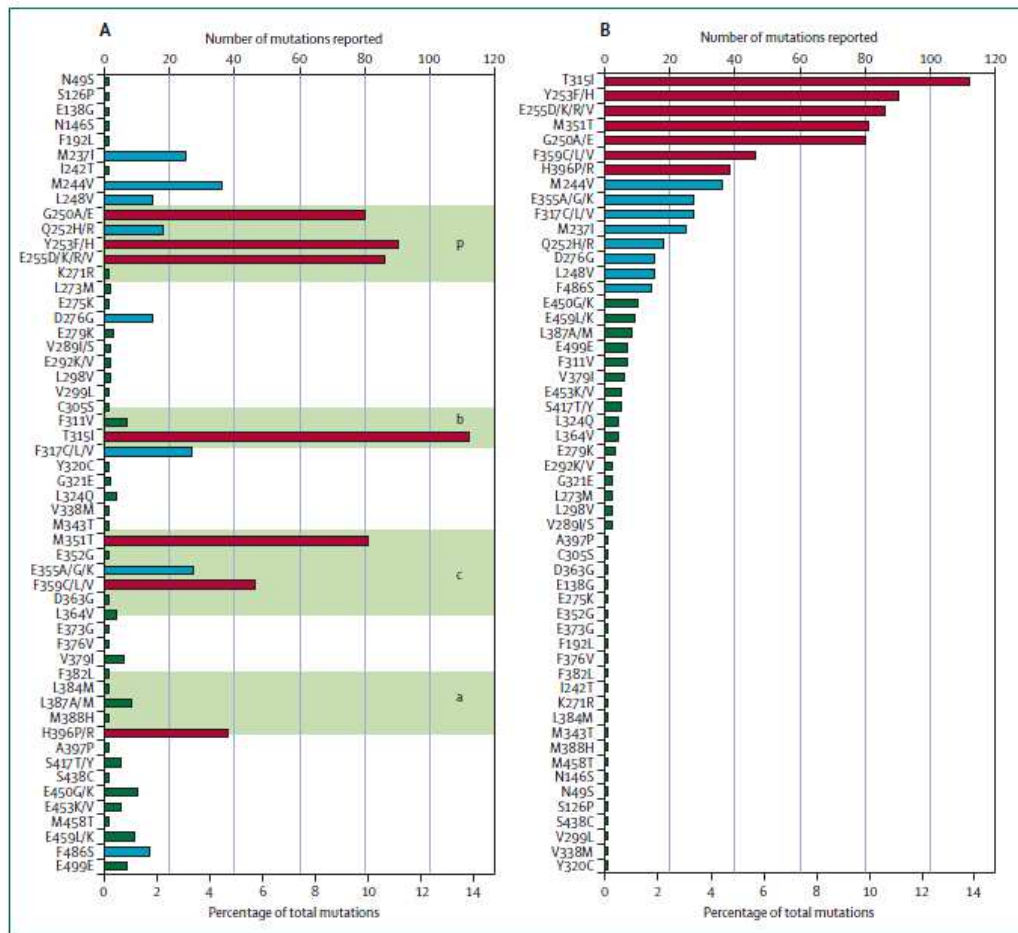


Figura 8 – (A) Incidência das diferentes mutações pontuais que ocorrem no domínio tirosina cinase de bcr-abl responsáveis pela aquisição de resistência ao IM na prática clínica. As sete mutações mais frequentes estão representadas a vermelho e as seguintes oito mutações mais frequentes a azul. As regiões específicas do domínio da tirosina cinase estão representadas pelas letras: (p) P-loop; (b) local de ligação do IM ; (c) domínio catalítico (a) A-loop; (B) Incidência de mutações por ordem de frequência. Adaptado de (30)

3.2 Aumento da expressão da proteína bcr-abl

A sobre-expressão da proteína bcr-abl, correspondente à amplificação do gene *BCR-ABL* foi inicialmente descrita por Mahon *et al* em linhas celulares resistentes ao IM e com ausência de mutações no domínio da proteína cinase bcr-abl, como um mecanismo de resistência ao fármaco. A amplificação do gene *BCR-ABL* foi primitivamente justificada na prática clínica num estudo do qual 3 dos 11 doentes com resistência adquirida ao IM, apresentavam múltiplas cópias do gene *BCR-ABL*, identificadas por FISH (“Fluorescence in situ hybridization”). (35)

Dos casos resistentes ao IM citados na prática clínica são diversas as variantes possíveis que justificam o aparecimento da resistência ao IM associado ao aumento e expressão de *BCR-ABL*: duplicação do cromossoma Ph, ocorrência de múltiplas cópias do

gene *BCR-ABL* no mesmo cromossoma, de ambos os fenômenos ou até da desregulação da transcrição do gene. O aumento da expressão do gene *BCR-ABL* traduz-se num aumento das proteínas-alvo que necessitam de ser inibidas pela dose terapêutica de IM. Deste modo, as concentrações terapêuticas do fármaco deixam de ser suficientes para inibir toda a quantidade de proteína bcr-abl que existe nas células. O aumento da dose de IM, em alguns casos pode superar este mecanismo de resistência contudo, os efeitos secundários graves resultantes do aumento da dose do fármaco podem limitar esta opção. (1)

Na prática clínica, a resistência ao IM resulta predominantemente de mutações pontuais no gene *BCR-ABL* do que propriamente da sua amplificação. (30)

Além destes, e tal como referido anteriormente, para além dos mecanismos de resistência ao IM dependentes da proteína bcr-abl, existem outros mecanismos independentes da mesma, envolvidos principalmente em casos de resistência secundária.

3.3 Alteração da expressão de proteínas transmembranares de efluxo e influxo

Uma vez que o IM se liga à cinase bcr-abl, os fatores que afetam a concentração intracelular do IM poderão influenciar a sua eficácia.

Muitos estudos têm mostrado variações na concentração de IM no interior das células-alvo dos doentes, sendo esta uma questão crítica do tratamento com este fármaco. Tal sugere que as doses de IM administradas diariamente, podem não garantir a manutenção de um nível de concentração intracelular necessário e suficiente para o efeito pretendido. São vários os fatores responsáveis por este efeito, incluindo: a forte metabolização do IM pelas enzimas do citocromo P450, diferenças na concentração das mesmas e na concentração do fármaco administrado que podem inibir ou induzir essa metabolização, afetando desse modo os níveis plasmáticos de IM e logo a sua concentração intracelular. (12)

Tem sido proposto em vários estudos, que a forte ligação do IM à proteína plasmática AGPI (“ α 1-acid glycoprotein-I”), pode resultar na diminuição dos níveis de fármaco ativo disponível para atingir as células-alvo, limitando a sua atividade terapêutica, bem como desenvolvendo resistência. Contudo, estes estudos não têm sido devidamente sustentados, e o impacto desta glicoproteína como causa de resistência ao IM permanece controverso. (12)

A quantidade de IM que realmente entra na célula-alvo é uma função direta do equilíbrio entre influxo e efluxo.

O transportador *MDR-1* ou *ABCB1* (“Adenosine Triphosphate-binding cassette transporter”) é uma proteína transmembranar que intervém na resistência em muitas neoplasias, através da regulação do efluxo de diferentes fármacos. A resistência a múltiplos fármacos mediada pelo produto do gene *MDR-1* é um mecanismo muito descrito em inúmeras patologias. O facto do gene *MDR-1* estar sobre-expresso em células de doentes com LMC em fase avançada, tem sido relacionado com o aparecimento da resistência ao IM, o que poderia resultar num aumento do efluxo do fármaco, resultando em concentrações intracelulares do mesmo insuficientes para bloquear completamente a replicação das células que expressam bcr-abl. (12) Estas células podem subsequentemente ser submetidas a mutações favorecendo a seleção de clones resistentes. O gene *MDR-1* pode portanto indiretamente participar na seleção de clones com bcr-abl mutado e amplificado. (36)

Alguns grupos de investigação têm mostrado o IM como um substrato para *MDR-1*. (12) Contudo, a taxa de efluxo do IM associada ao gene *MDR-1* é menor do que quando comparada a outros fármacos citotóxicos. Deste modo, o papel do gene *MDR-1* na resistência ao IM ainda não se encontra bem determinado, sendo contraditório em alguns estudos desenvolvidos. Em alguns trabalhos experimentais, realizados por Mahon *et al*, com algumas linhas celulares resistentes ao IM foi possível identificar um aumento da expressão do gene *MDR-1*. (35) Recorrendo a amostras de doentes com LMC Crise Blástica e utilizando dois inibidores de *MDR-1*, Che e Kotaki, conseguiram restabelecer a sensibilidade das células leucémicas ao IM. (37) (38) É de salientar outros estudos em linhas celulares resistentes ao IM, realizados por Kotaki e Rumpold, que recorreram à tecnologia do RNAi para regular a expressão do gene *MDR-1* e restaurar a sensibilidade ao IM nestas linhas celulares, demonstrando, paralelamente, um aumento da concentração intracelular de IM. (39) Contudo, Languet *et al* demonstraram uma resposta clínica semelhante ao IM, em doentes com LMC Crise Blástica independentemente do nível de expressão de *MDR-1*. (40) Noutro estudo realizado, Galimberti *et al* mostrou que os doentes que não atingiram Resposta Citogenética Completa, eram portadores de um aumento da expressão do gene *MDR-1*. (41)

Alguns transportadores de influxo, nomeadamente hOCT1 (“Organic Cation Transporter”) têm sido investigados como potenciais intervenientes na aquisição da resistência ao IM. A inibição do influxo de IM através de hOCT1 tem sido um mecanismo sugerido para a regulação da concentração intracelular de IM. Polimorfismos neste transportador podem causar alterações na quantidade de IM que entra dentro da célula-alvo.

No entanto, embora *hOCT1* possa estar relacionado com a regulação do influxo de IM na célula leucémica, em doentes com LMC esta relação ainda não se encontra totalmente identificada. (39)

Num estudo realizado com doentes diagnosticados em Fase Crónica, sujeitos ao tratamento com IM numa dose de 600mg/dia, foi demonstrado que o grupo de doentes com maior atividade do transportador de influxo *hOCT1* apresentava maior resposta molecular ao fármaco, e um IC50 mais baixo, do que se verificava no grupo de doentes com baixa atividade deste transportador membranar. Este resultado vem reforçar a hipótese de que a atividade deste transportador pode ter um papel relevante na resistência ao IM. (42)

3.4 Alterações na regulação de mecanismos de transdução de sinal

Tal como referido na secção 1.3, a transformação celular induzida pela proteína quimérica *bcr-abl* altera a sinalização celular, as interações célula a célula, a regulação do ciclo celular e da apoptose através da modulação de inúmeras cascatas de sinalização direta ou indiretamente. Um dos fatores críticos na resistência aos TKIs é identificar se a doença é dependente ou independente do oncogene *BCR-ABL*.

A proteína quimérica *bcr-abl* pode ativar várias vias de sinalização, como anteriormente descrito, nomeadamente a via das MAP cinases, JAK cinases e consequente fosforilação da família STAT, etc. Talvez a via de sinalização mais bem estudada e caracterizada seja a via que envolve a família das SRC cinases (SFKs), a qual é apontada como um fator importante na alteração de resposta aos TKIs, assim como na progressão da doença.

Em alguns doentes resistentes ao IM verifica-se que o mecanismo de resistência tem por base alterações em vias de sinalização intracelulares independentes de *bcr-abl*. A ativação das *src* cinases pode levar a um mecanismo de resistência ao IM independente de *bcr-abl*. Esta proteína quimérica interage diretamente com algumas *src* cinases, que posteriormente alteram o estado da cinase *bcr-abl* para a sua conformação ativa, o que influencia a sua suscetibilidade ao IM. (33)

São vários os estudos que demonstram quer em modelos “in vitro”, quer em amostras clínicas, a relação entre a família das cinases *src* e algumas formas de resistência independentes de *bcr-abl*. (43)

Num estudo realizado em 2003 por Donato *et al*, foi identificada pela primeira vez num modelo celular resistente ao IM a sobre-expressão da proteína *lyn*, a mais abundante da

família das proteínas src cinases nas células hematopoiéticas. Neste modelo celular, a sobre-expressão e ativação da proteína lyn exerce um papel fundamental na proliferação e sobrevivência destas células. Inibidores específicos destas cinases, previamente descritos para serem dirigidos às proteínas src cinases, PP2 (inibidor das src cinases), ou com a função de inibirem quer as cinases abl quer as src, PD180970 (inibidor das cinases src e abl) em células com expressão positiva para *BCR-ABL*, levaram à supressão da proliferação celular e à morte das células resistentes por apoptose. (44)

Em doentes com LMC resistentes ao IM, a proteína lyn é ativada independentemente da proteína bcr-abl, permitindo a sobrevivência das células na presença do fármaco. Vários trabalhos têm sido realizados posteriormente, nos quais se tem vindo a confirmar o envolvimento da sobre-expressão das proteínas src na resistência ao IM.

Algumas moléculas que inibem simultaneamente a cinase bcr-abl e as cinases src, Dasatinib, Bosutinib, etc. têm vindo a ser estudadas no sentido de tentar ultrapassar esta problemática da resistência ao IM. (45)

3.5 Evolução Clonal

A progressão da doença além da Fase Crónica tem vindo a ser associada com a expansão clonal de células estaminais hematopoiéticas, isto é, a aquisição de anormalidades adicionais nos cromossomas Ph^+ . A presença da expansão clonal das células estaminais hematopoiéticas, está relacionada com uma diminuição da resposta ao IM e tem sido proposta como um mecanismo de resistência independente da proteína bcr-abl. Em cerca de 95% dos doentes que respondem ao tratamento com IM, é possível detetar uma quantidade residual de células *BCR-ABL* positivas. A presença destas células é o resultado da característica refratária das células estaminais hematopoiéticas *BCR-ABL*⁺ ao IM. (30)

Uma das principais características das células estaminais hematopoiéticas *BCR-ABL*⁺ é o facto de conseguirem ser quiescentes. Todos os fármacos habitualmente usados no tratamento da LMC, como o IM, outros TKIs, citostáticos convencionais, atuam no sentido de inibir a proliferação celular e induzir o processo da apoptose celular, não sendo portanto eficazes no impedimento da proliferação das células estaminais progenitoras. Esta ineficácia é suportada pela observação clínica de que o tratamento dos doentes é raro e a recaída é quase sempre inevitável após o final do tratamento com o IM, mesmo nos doentes que durante o tratamento com este fármaco conseguem eliminar todos os transcritos de *BCR-*

ABL. Estas células estaminais quiescentes persistem mesmo após terem sido atingidas as respostas quer hematológica quer citogenética completas após o tratamento com IM. (46)

Em mais de 90% de doentes com LMC tratados com uma dose de 400mg de IM e em mais de 60% de doentes tratados com uma “dose standard” de IM de 800mg diária e que respondem ao tratamento, é possível detetar uma quantidade residual de células BCR-ABL positivas. Estas células não são apenas responsáveis pelo aparecimento das recaídas nos doentes, mas também por proporcionarem um conjunto de mutações na proteína bcr-abl que poderão ser responsáveis pelo aparecimento de clones resistentes ao IM e que permitirão a progressão da doença. (46)

Num estudo realizado por Lahaye *et al* a cerca de 300 doentes em várias fases da doença, foi possível verificar que quer a impossibilidade de atingir a resposta ao tratamento, quer a perda da resposta ao fármaco era mais provável de ser associada à expansão clonal do que a mutações no domínio da cinase bcr-abl. Cerca de 73% dos doentes em Crise Blástica exibiram expansão clonal comparativamente aos 30% de doentes com mutações no domínio da proteína abl, como justificação para a perda de resposta ao fármaco. (47)

O mecanismo molecular exato para explicar a resistência intrínseca destas células hematopoiéticas ao IM ainda não se encontra totalmente esclarecido. Existem alguns mecanismos propostos para explicarem tal resistência como por exemplo: o carácter quiescente deste tipo de células, bem como a sua plasticidade, a sobre-expressão de BCR-ABL e a alteração da expressão das proteínas membranares, uma vez que interferem quer no influxo bem como no efluxo do fármaco. Por outro lado, a instabilidade genómica provocada pela desregulação da proteína bcr-abl, pode levar à acumulação de mutações em vários genes responsáveis pelos mecanismos de sobrevivência celular. A seleção destes clones em consequência do tratamento com IM irá permitir a progressão da doença. (48)

4. ESTRATÉGIAS PARA ULTRAPASSAR A RESISTÊNCIA AO IMATINIB

A crescente expansão do conhecimento acerca dos diferentes mecanismos moleculares de resistência ao IM, tem vindo a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias que têm como objetivo superar a resistência ao IM que comumente atinge os doentes com LMC inicialmente sensíveis a este fármaco. O fenómeno da resistência ao IM tem vindo a tentar ser ultrapassado através do recurso a várias estratégias que atuam a vários níveis e de que se salientam os TKI's de segunda e terceiras gerações. (1)

4.1 TKI's de segunda e terceiras gerações

4.1.1 TKI's de segunda geração

Os TKI's de segunda geração aprovados para o tratamento da LMC até à data são o Nilotinib (AMN107, desenvolvido pela Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland - Tasigna®) e o Dasatinib (BMS-354825, desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb, Princeton, USA - Sprycel®). Na Figura 9 são apresentadas as estruturas químicas destes compostos.



Figura 9 – Estrutura química do Nilotinib (A) e Dasatinib (B). Adaptado de (28)

À semelhança do IM, o Nilotinib liga-se à proteína abl na conformação inativa. Este fármaco é entre 10 a 25 vezes mais potente quando comparado com o IM no que respeita à redução da autofosforilação da proteína e proliferação celular. A sua eficácia foi comprovada em 32/33 *BCR-ABL* mutantes resistentes ao IM. (1)

O Dasatinib inibe a atividade da cinase bcr-abl, bem como de cinases da família src juntamente com um número de outras cinases oncogénicas nomeadamente c-kit, cinases do recetor da efedrina (EPH) e recetor PDGFR- β . Este fármaco é um potente inibidor que se liga tanto à conformação ativa, como à conformação inativa de bcr-abl (300 vezes superior ao IM). Uma vez que este fármaco é mais potente e possui outros mecanismos de ação pode ser eficaz nos doentes resistentes ao IM, como demonstrado já em alguns estudos. (49)

Shah *et al.*, demonstraram recentemente que o Dasatinib tem 100 vezes maior atividade contra a cinase bcr-abl quando comparado com o IM, além de que consegue manter atividade contra 14 dos 15 mutantes de *BCR-ABL* resistentes ao IM “in vitro”. (50)

É de salientar que nenhum destes inibidores de segunda geração é eficiente no combate à resistência resultante do mutante T315I. (49)

4.1.2 TKI's de terceira geração

São várias as moléculas em investigação e com diferentes mecanismos de ação que visam o combate da resistência ao IM nos doentes portadores da mutação T315I, cerca de 15% dos doentes resistentes a este fármaco. (33)

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que o Ponatinib (AP24534), um inibidor oral ativo de bcr-abl (entre outras cinases), pode ultrapassar o espectro inteiro de mutações que causam resistência a outros inibidores desta tirosina cinase, incluindo o mutante mais resistente T315I. Estes resultados têm sido também confirmados com ensaios clínicos (Fase II). A ligação tripla carbono-carbono é a característica estrutural deste fármaco que faz a ligação hidrofóbica com a cadeia lateral de mutante I315, permitindo a sua inibição. A extensa área de contactos moleculares otimizados conduz a uma potência elevada e torna a ligação menos suscetível à quebra por interrupções de um único ponto (“a single-point mutations”). (1)

O Bosutinib (SKI-606), outro TKI de terceira geração (aprovado pela FDA para LMC em setembro de 2012), tem mostrado uma boa atividade em doentes resistentes ao IM. Em concentrações nanomolares inibe a autofosforilação da cinase bcr-abl, assim como da cinase src, o que se traduz na inibição do crescimento celular, bem como da apoptose celular. Devido ao seu duplo mecanismo de ação, o Bosutinib mostra atividade na LMC resistente, bem como noutras doenças mieloides e em tumores sólidos. Este fármaco provoca menos efeitos secundários do que os TKI's de segunda geração, uma vez que inibe mais

seletivamente as proteínas defeituosas nas células leucêmicas, não afetando as proteínas semelhantes nas células normais. (1)

Recentemente, foram descritos dois novos compostos: ONO12380 e Tozasertib (MK-0457), que revelaram ser capazes de inibir a atividade da cinase bcr-abl em linhas celulares que expressam a mutação T135I. (1)

A decisão terapêutica ideal, principalmente em pesquisas futuras acerca do tratamento de primeira linha na LMC, passará pela identificação do tipo de resistência, isto é, se a resistência é um fenômeno adquirido com o decorrer da terapêutica, ou uma característica pré-estabelecida da patologia. No entanto, até que tal seja clarificado, outras opções terapêuticas para doentes resistentes ao IM são extremamente necessárias e continuam a ser uma área de investigação intensiva. Na tabela seguinte (Tabela 2) podemos observar algumas moléculas inibidoras de múltiplas cinases que se encontram em várias fases de investigação clínica, com o objetivo de ultrapassar a resistência ao IM na LMC. (33)

Tabela 2. Novas moléculas em fase de investigação clínica para o tratamento da LMC que têm como alvo diferentes cinases.

	Alvo Molecular	Fase de Investigação Clínica
Bosutinib (SKI 606)	ABL, FGR, LYN, SRC	Aprovado em Setembro de 2012
Tozasertib (MK- 0457)	Aurora cinases, FLT3, JAK2, ABL	Fase II
Rebastinib (DCC2036)	SRC, LYN, FGR, HCK, FLT3, TIE2	Fase II
Sorafenib (Bay43006)	KIT, FLT3, CRAF, BRAF, VEGFR-3, PDGFR	Fase II
NS-187	ABL, KIT, LYN, PDGFR	Fase I/II
Ponatinib (AP24534)	ABL, FGFR1, FLT3, KIT, VEGFR	Fase II
XL228	ABL, Aurora A, FGFR1-3, SRC, IGF1R	Fase I
AT9283	ABL, Aurora A e B, FLT3, JAK2, JAK3	Fase I/II
PHA739358	ABL, Aurora A e B, FGFR1, RET, TRK	Fase II
KW-2449	ABL, Aurora A, FGFR1, FLT3	Fase I

Adaptado de (33)

O Ponatinib (AP24534) já anteriormente descrito, tem sido o candidato de excelência, já se encontrando na fase II de ensaios clínicos. Outra molécula promissora, também referenciada na Tabela 2 com atividade contra o mutante *BCR-ABL* T315I é o Rebastinib (DCC2036), que se encontra atualmente em fase II de ensaios clínicos. É um inibidor potente dos mutantes resistentes de *BCR-ABL*, e é esperado que consiga tratar os doentes que falharam na resposta aos outros inibidores desta cinase. O Rebastinib também inibe outras cinases para além de *bcr-abl*, nomeadamente *flt3-itd* (“*fms-like tyrosine kinase recetor-3*”), *tie2* (“*tyrosine kinase with immunoglobulin-like and egf-like domains2*”), *kdr* (“*kinase insert domain recetor A gene*”), *sfk* (*src family kinase*, nomeadamente *lyn*) e *trka* (“*tropomyosin-recetor-kinase A*”).

Este fármaco prepara-se para estar biodisponível por via oral, apresentando um perfil que visa um bom desempenho nos ensaios de segurança. (51)

Em ensaios de proliferação das linhas celulares Ba/F3, bem como em modelos animais, este fármaco mostrou ser eficaz quer em *BCR-ABL* nativo, quer nos *BCR-ABL* mutantes resistentes ao IM, como Y253F, T315I e M351T.

Em fase pré-clínica de desenvolvimento, encontram-se ainda algumas moléculas, das quais se salientam o HG-7-85-01, que utiliza uma estrutura modificada do híbrido Nilotinib-Dasatinib para evitar a mutação T315I, e o GNF-2, um inibidor alostérico de *abl*, que tem vindo a ser estudado em associação com os inibidores competitivos ATP-*abl*. (51)

O Sorafenib (Bay 43006) é um inibidor de múltiplas cinases, que demonstrou propriedades antiproliferativas e antiangiogénicas tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Este fármaco encontra-se em fase II de ensaios clínicos para LMC resistente ao IM e tem mostrado resultados estabilizadores na evolução da doença. O mecanismo de ação do Sorafenib envolve a diminuição da proliferação das células tumorais diminuindo a angiogénese tumoral. (51) O Sorafenib inibe a atividade de alvos presentes nas células tumorais (*craf*, *braf*, *v600e braf*, *c-kit*, e *flt-3*) e na vasculatura tumoral (*craf*, *vegfr-2*, *vegfr-3*, e *pdgfr-β*). As cinases *raf* são cinases serina/treonina e o *c-kit*, *flt-3*, *vegfr-2*, *vegfr-3*, e *pdgfr-β* são recetores da tirosina cinase. (16) O Sorafenib é considerado um fármaco bastante promissor para o combate da resistência ao IM.

Na Figura 10 podemos observar em esquema a possibilidade da eficácia dos inibidores da cinase *bcr-abl* (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib e Rebastinib) em três cenários terapêuticos distintos, nomeadamente: na inibição de *bcr-abl* nativo, de *bcr-abl* mutante (resistente ao IM) e como um componente de controlo da LMC na resistência independente de *bcr-abl*.

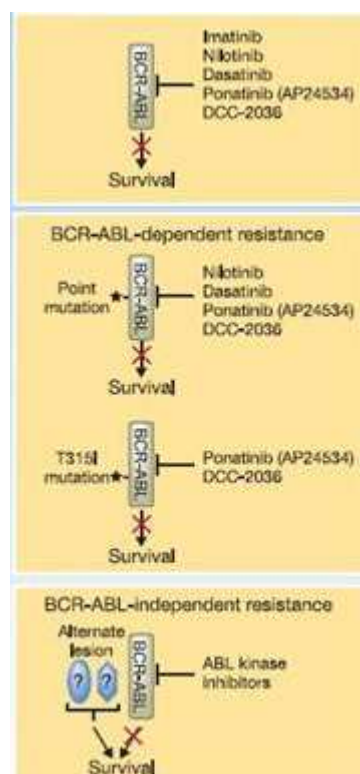


Figura 10 – Esquematização da eficácia prevista dos inibidores da tirosina cinase bcr-abl em três cenários terapêuticos distintos: na inibição de bcr-abl nativa (topo); na inibição de bcr-abl mutante (meio) e como um componente de controlo da LMC que envolve vias alternativas independentes de bcr-abl (parte inferior). Adaptado de (51)

4.2 Terapêutica combinada

Tal como previamente referido, os TKI's por si só podem induzir remissão na LMC, embora não consigam eliminar as células estaminais leucémicas, que continuam a ser uma fonte de recaída nesta patologia. A monoterapia tem sido frequentemente associada ao aparecimento da formação de mutantes. A terapêutica combinada envolve a combinação de dois ou mais fármacos, um dos quais é muitas das vezes um TKI, sendo portanto uma possível estratégia para ultrapassar a formação de mutantes que leva ao aparecimento da resistência aos fármacos. (1)

Estudos recentes demonstram que a combinação do IM com um inibidor da Histona Desacetilase (HDACi) induz apoptose nas células progenitoras quiescentes da LMC resistentes à monoterapia com o IM. A interação do IM e dos HDACIs inibe a manutenção e sobrevivência dos genes reguladores das células estaminais hematopoiéticas. (52)

O Panobinostat (LBH-589), um inibidor da HDACi, induz a degradação de bcr-abl em doentes com LMC Crise Blástica. É um fármaco que pode ser associado a outros TKI's, ou usado isoladamente em doentes portadores da mutação T315I. Prevê-se que a associação deste fármaco ao IM, potencie a sua ação no tratamento da LMC. Esta associação encontra-se na fase II de ensaio clínico e visa o tratamento de doentes que foram previamente tratados com IM e se tornaram resistentes a este fármaco. (52)

A associação do IM com o INF- α tem vindo a ser alvo de vários ensaios clínicos promissores que visam o tratamento da LMC Fase Crónica, como ilustra a Tabela 3, tendo como objetivo ultrapassar as resistências que comumente aparecem aos TKIs. Destes, merece particular relevo o estudo realizado em 12 meses por Burchert *et al* com a combinação de peginterferon alfa-2a e IM. A taxa de Resposta Molecular Completa foi significativamente maior entre doentes que receberam IM e peginterferon alfa-2a (30%), comparativamente com os que receberam apenas 400mg de IM. Neste estudo foi também demonstrado que o tratamento com INF- α permite a interrupção do IM, na maioria dos doentes após terapêutica prévia de combinação com o mesmo, podendo resultar numa resposta molecular melhorada. (53)

Tabela 3. Associações do IM com o INF em fase de ensaio clínico. (Clinical trials.gov, Acedido a 30/09/2012)

Fármacos	Patrocinador	Investigação	Fase de ensaio clínico
PEG-INF-α 2b (Peg-Intron) + IM ou Nilotinib	University of Michigan Cancer Center	LMC FC	Fase II
PEG-INF-α 2b + IM + GM-CSF (Sargramostim)	M. D. Anderson Cancer Center, com colaboração da Novartis	LMC – FC inicial	A decorrer, mas não recruta participantes
Interferon – α+ Citarabina (AraC) + IM	Novartis	Doentes com LMC recém-diagnosticados	Fase III

A combinação de fármacos para o tratamento da LMC é uma estratégia muito utilizada no combate da resistência ao IM, ou quando os doentes não respondem a este TKI. O número elevado de combinações de fármacos que se encontra em fase de ensaio clínico, com o objetivo de tratar esta patologia, é a prova que se trata de uma estratégia bastante aliciante. Na tabela seguinte (Tabela 4) são apresentadas mais algumas das associações terapêuticas em investigação clínica, que têm como principal objetivo a possibilidade de contribuírem para o tratamento desta patologia.

Tabela 4. Associações terapêuticas em fase de investigação clínica para o tratamento da LMC. (Clinical trials.gov, Acedido a 30/09/2012)

Fármacos	Patrocinador	Investigação	Fase de ensaio clínico
Trióxido de Arsénio + IM	New Mexico Cancer Care Alliance	LMC com evidência citogenética de doença residual	Fase II
Homoharringtonina + IM	Chembenex Pharmaceuticals	LMC FC, CB e FA	Fase II
Zyflo (inibidor da 5-lipooxigenase) + IM	University of Massachusetts, Worcester	LMC FC	Fase I
RAD001 (Everolimus) + IM	University of Michigan Cancer Center	LMC, tendo como alvo terapêutico as células estaminais leucémicas	Fase I / II
Azacitidina (AZA) Vidaza®+ TKI	M.D. Anderson Cancer Center	LMC, com doença mínima residual	Fase I / II
Quimioterapia (Daunorrubicina + Citarabina) + IM	Poitiers University Hospital, com colaboração da Novartis	LMC em FA mieloide	Fase I / II
Tall-104 cells (Linha celular de células T citotóxicas) + IM	M.D. Anderson Cancer Center, com a colaboração de Abiogen Pharma	LMC FC	Fase II
Ácido Zoledrónico + IM	Institut Bergonié, com colaboração da Novartis	LMC sem resposta molecular após tratamento com IM	Fase II
AG-858 + IM	Agenus, Inc.	LMC, em doentes com resposta citogenética positiva após tratamento com IM	Fase II

4.3 Estratégias que envolvem o ajuste da concentração plasmática de IM

Uma das estratégias mais utilizadas até à data para ultrapassar a resistência ao IM é o aumento da dose do fármaco. Em doentes na Fase Crónica da doença, que se tornaram resistentes às doses convencionais de IM de 300 ou 400mg/dia, o aumento da frequência desta dose de IM para duas vezes ao dia resultou na Resposta Hematológica Completa em 65% dos doentes com resistência hematológica. Contudo a duração desta resposta ao aumento da dose do fármaco, nem sempre é muito longa. (54)

O IM é metabolizado principalmente pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5 do citocromo P450. Diferenças na expressão de CYP3A4/CYP3A5 ou fármacos que possam inibir ou induzir as referidas enzimas têm potencial para afetar consideravelmente os níveis plasmáticos de IM. Assim, o aumento da dose de IM para 600-1000mg/dia pode ultrapassar a resistência às doses “padrão” de IM (400mg/dia) em alguns doentes com LMC. No caso das mutações no P-loop, o aumento de dose do IM não é recomendado devido à elevada resistência destas mutações. Além disso é possível que este tratamento apenas beneficie os doentes que tenham níveis de IM intracelular subóptimos com as doses “padrão” de IM. (1)

Os transportadores de fármacos são cada vez mais reconhecidos como fatores determinantes na distribuição das drogas bem como na sua resposta.

O facto de P-gp poder ser responsável pelo aparecimento de resistência celular ao IM, oferece a oportunidade para uma modulação farmacológica do presente sistema de transporte. São muitos os estudos que têm demonstrado que a regulação da expressão desta glicoproteína resulta num aumento da sensibilização das células para alguns fármacos antineoplásicos. Assim, o recurso à biotecnologia, nomeadamente RNAi, dirigido ao gene *MDR1* tem vindo a permitir um aumento da sensibilidade das células leucémicas, bem como um aumento da sensibilidade das células com LMC ou LMA à daunorrubicina. Além disso, a regulação da expressão de P-gp pelo RNAi tem permitido ultrapassar a resistência de algumas linhas celulares, nomeadamente de LMC a alguns fármacos. (36)

Curiosamente, com o objetivo de tentar esclarecer esta validação, um grupo de investigadores portugueses deu mais um passo nesse sentido, através da regulação da expressão de P-gp em células LMC que sobre-expressam esta glicoproteína e que são resistentes ao IM. O estudo tentou verificar se esta regulação com o recurso a siRNAs (“small interfering RNA”) aumentaria a sensibilidade das células leucémicas ao IM através do aumento da apoptose nessas células, o que permitiria validar esta glicoproteína como um possível alvo terapêutico molecular que poderia servir como terapêutica adjuvante no

tratamento da LMC com IM. Este grupo de investigadores conseguiu provar que a regulação do gene *MDR1* com siRNA nas linhas celulares K562 consegue reverter a resistência ao IM através do aumento de células que entram em apoptose.

Com este estudo foi possível concluir que, como tinham proposto inicialmente, P-gp pode ser considerado um bom alvo molecular terapêutico como adjuvante à terapêutica com IM na LMC, bem como que o aumento do efeito do fármaco tem como base o aumento do número de células que entra no processo de apoptose. (55)

Apesar de na prática clínica ainda não estar em curso nenhum estudo neste sentido, são muitas as equipas de investigação que se dedicam a esta temática e que em linhas celulares tentam mostrar a importância do papel dos transportadores de fármacos, nomeadamente P-gp, na problemática da resistência ao IM na LMC.

Tem sido evidenciado que a concentração intracelular de IM deve ser considerada numa perspetiva mais abrangente, que integre não só os transportadores de efluxo mas também os de influxo, como hOCT1 que também tem sido considerado um determinante crítico na concentração de IM intracelular disponível e que, como tal, pode levar à resistência ao fármaco.

Vários estudos determinam que o IM é um substrato de hOCT1. Tal sugere que a expressão diferencial deste transportador de influxo em células-alvo pode ser um determinante crítico dos níveis intracelulares de fármacos e consequentemente da resistência ao tratamento da LMC com IM. Os mesmos estudos evidenciam que os níveis de expressão celular de hOCT1 têm sido muito menores nos doentes que não respondem ao tratamento da LMC com IM do que nos que respondem. (56)

A Figura 11 representa esquematicamente os diferentes transportadores envolvidos no influxo e efluxo do IM e o impacto da sua relativa desregulação.

São inúmeros os estudos que têm demonstrado que a concentração intracelular de IM resulta do equilíbrio entre os transportadores de influxo (*hOCT1*) e efluxo (*MDR1*). Uma expressão diferencial ou funcional destes transportadores conduzirá à diminuição da concentração intracelular de IM. Estes mecanismos de resistência ao IM podem ocorrer em doentes com LMC. Todos os estudos desenvolvidos em linhas celulares ou amostras de doentes com esta patologia têm contribuído para a correlação entre a expressão e função destes transportadores com o seu prognóstico clínico, tendo como objetivo permitir o desenvolvimento futuro de novas estratégias terapêuticas que superem a resistência ao IM e aumentem a sua atividade clínica. (57)

De acordo com o nosso conhecimento, até à data não há referência de nenhum ensaio clínico fazendo uso desta estratégia.

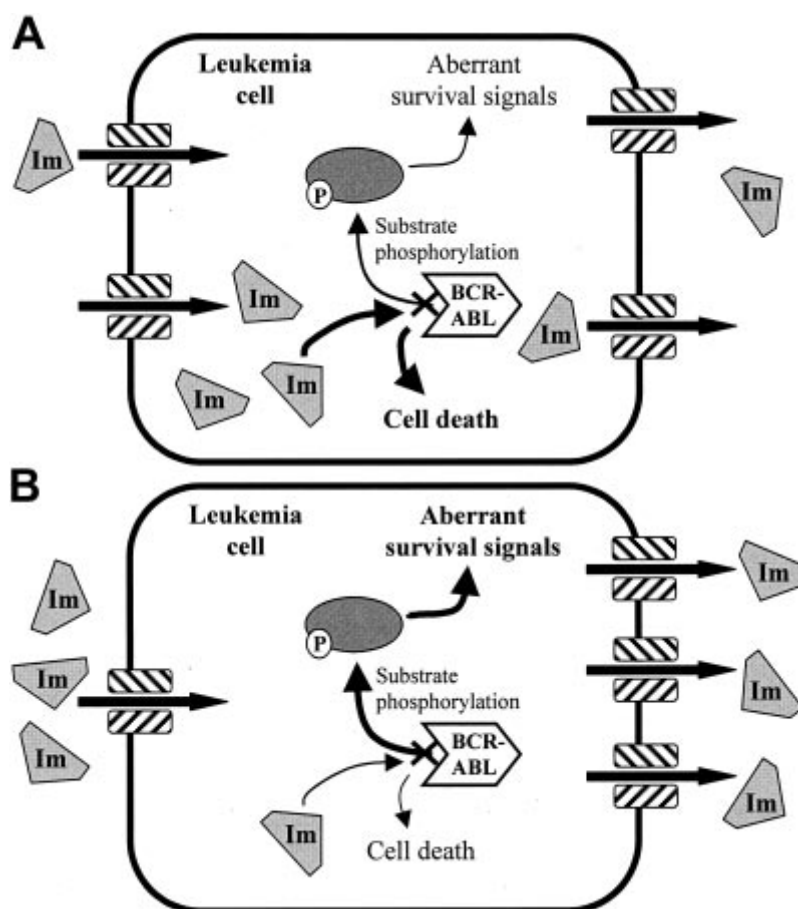


Figura 11 – Consequências da expressão alterada dos transportadores de fármacos na concentração intracelular de IM. (A) Em condições normais, uma adequada concentração de Imatinib (IM) é alcançada no interior celular e a célula leucêmica sofre morte celular; (B) Com a sobre-expressão dos transportadores de efluxo e a diminuição dos transportadores de influxo, a concentração de Imatinib (IM) é demasiado baixa para inibir a proteína quimérica bcr-abl de forma a provocar a morte celular. Adaptado de (57)

4.4 Estratégias envolvidas na destabilização da proteína bcr-abl

Existe uma ampla evidência genética de que a oncoproteína bcr-abl não é apenas necessária, mas também suficiente para a transformação das células hematopoiéticas. Portanto a própria oncoproteína bcr-abl é considerada um alvo atraente para o desenho de estratégias que visam o combate da resistência ao IM. A Figura 12 ilustra uma estratégia para destabilizar a proteína bcr-abl.

A estabilidade da oncoproteína bcr-abl encontra-se dependente da sua capacidade para formar um complexo com HSP90 e com a proteína p23. Antagonistas de HSP90, como Tanespimycin® (I7-AAG) interferem com bcr-abl de tal forma que a proteína madura torna-se incapaz de adquirir a sua estrutura quaternária, ficando suscetível à degradação no proteossoma. (1)

Assim, sendo esta mais uma das estratégias possíveis para o combate desta problemática, já se reportam estudos envolvendo a combinação de IM com I7-AAG, cujos resultados evidenciam efeitos sinérgicos em linhas celulares da LMC primárias em Fase Crónica sensíveis ou resistentes ao IM. Quando a resistência ao IM resulta da sobre-expressão de *BCR-ABL*, verifica-se uma concomitante resistência ao I7-AAG. Tal facto realça a importância da identificação do mecanismo de resistência antes de iniciar o tratamento de segunda linha. (17)

A associação do IM com um inibidor de HSP90 (Tanespimycin®), já se encontra na fase I de ensaio clínico, para o tratamento da LMC Crise Blástica e LMC Fase Acelerada em doentes resistentes ao IM. (58)

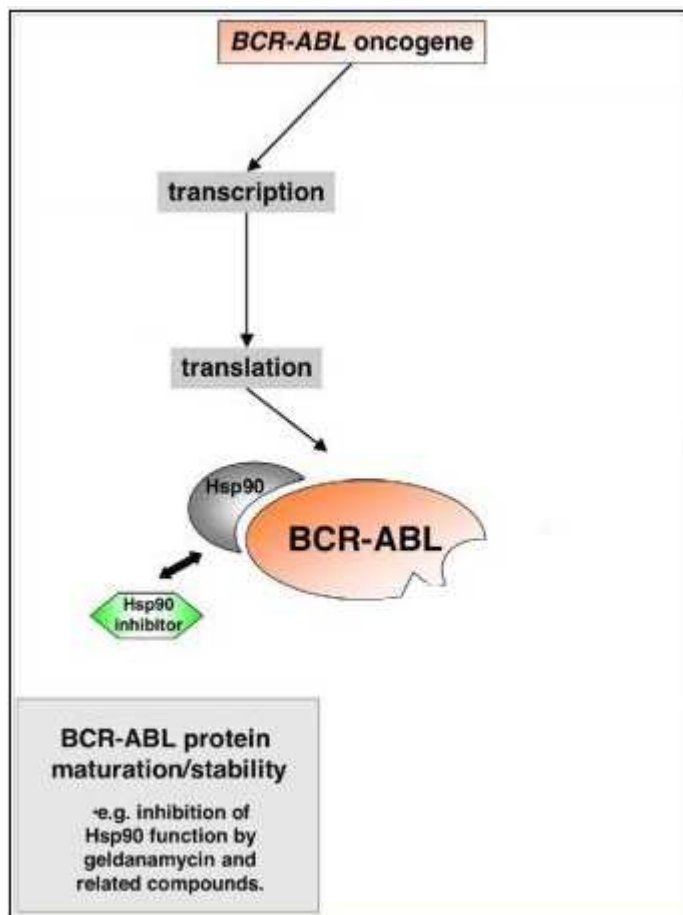


Figura 12 – Estratégia que tem como alvo a oncoproteína bcr-abl na LMC. Através da ligação de moléculas inibidoras de Hsp90 é possível destabilizar a oncoproteína bcr-abl, que conseqüentemente é degradada no proteossoma. Adaptado de (17)

4.5 Estratégias de silenciamento do mRNA da bcr-abl

Desde a década de 90 que o silenciamento de genes, quer através do recurso aos oligonucleotídeos *antisense* (asODN), aos “locked nucleic acids” (LNA), às ribozimas, bem como ao RNA de interferência (RNAi), tem evidenciado particular destaque na inibição da expressão de alguns genes causadores de doença. Na área da oncologia a sua utilização é evidente e tem vindo a ser alvo de avanços significativos com o decorrer dos anos, tratando-se de uma potencial terapia alvo molecular dirigida. A proteína bcr-abl é, sem dúvida, um bom alvo molecular para as estratégias de silenciamento posteriormente descritas.

4.5.1 Oligonucleotídeos *Antisense*

Os oligonucleotídeos antisense (asODN) foram criados para se ligarem a um mRNA específico através da hibridação Watson-Crick, com o objetivo de inibir a sua tradução e conseqüentemente bloquear a transferência da informação genética do DNA para a proteína. Os oligonucleotídeos são moléculas de cadeia simples de DNA que podem ou não ser modificadas quimicamente. De um modo geral são relativamente curtos, habitualmente o seu comprimento varia entre 12 e 25 nucleótidos, tendo a maioria dos asODN entre 18 e 21 nucleótidos que hibridam com uma única sequência de um vasto grupo de alvos presente nas células. O mecanismo de ação dos asODN inclui o bloqueio da tradução, nomeadamente através das nucleases endógenas celulares, como a RNase H. (59)

Através da conceção de um oligonucleotídeo antisense que seja complementar às sequências *BCR* e *ABL* em ambos os lados da junção do transcrito *BCR-ABL*, é possível obter uma espécie que irá hibridar com *BCR-ABL* mRNA, formando heteroduplexes de oligonucleotídeos mRNA que irão impedir a associação de *BCR-ABL* mRNA com os ribossomas e ativar o processo de degradação pela RNase H.

Embora não seja muito complicada a síntese dos oligonucleotídeos, a sua utilização é limitada, uma vez que são rapidamente degradados pelas endonucleases intracelulares e exonucleases, normalmente com atividade via 3'→5'. (60)

Na última década, as estratégias antisense com o objetivo de suprimir a expressão do oncogene *BCR-ABL* nas células leucémicas, têm recebido especial atenção por parte de alguns grupos de investigação, encontrando-se algumas dessas estratégias já em fase de ensaio clínico. (1)

Apesar de promissores, existem ainda várias limitações à aplicação desta estratégia, nomeadamente: a falta de especificidade dos asODN, necessidade de entrada intracelular, bem como a semivida extremamente longa da proteína *bcr-abl*. Outra das desvantagens deste método inclui as elevadas quantidades de oligonucleotídeos antisense necessários para alcançar uma dose efetiva e deste modo um potencial de toxicidade como resultado da sua falta de especificidade.

Os LNA ("Locked nucleic acid") têm sido propostos como moléculas antisense cujas propriedades já se encontram bastante melhoradas comparativamente aos asODN de primeira geração. Um LNA é muitas vezes referido como um RNA inacessível, portanto um

análogo ribonucleotídeo que contém uma ligação de metileno entre o oxigênio 2' e o carbono 4' do anel de ribose. Esta restrição bloqueia a ribose no C-3', o que resulta numa elevada afinidade para as sequências de DNA e RNA. (61)

Rapozzi *et al*, descreveram duas novas sequências de LNAs concebidas para regiões específicas do mRNA de *BCR-ABL*, tal como ilustrado na Figura 13, tendo assistido à sua atividade em células K562 e KYO-I, em termos de supressão do gene, inibição da proliferação celular, estimulação da apoptose e sensibilização ao IM. (61)

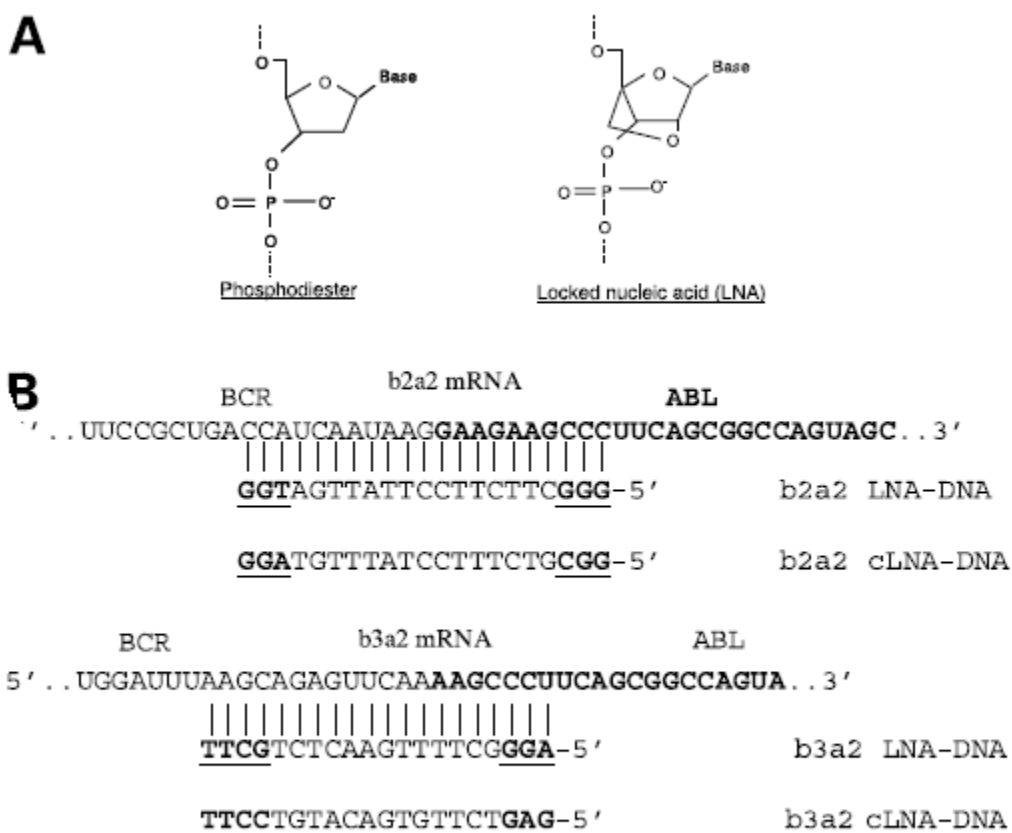


Figura 13 – A. Estrutura química dos nucleótidos de DNA e LNA; B. Sequências das junções b2a2 e b3a2 de *BCR-ABL* mRNA e a sequência dos “gapmers”. As bases sublinhadas a negrito são monómeros de LNA. Para cada junção, um “gapmer” de controlo com a mesma base contendo o “gapmer antisense” mas com uma sequência diferente foi sintetizado. De notar que os “gapmers” são asODN modificados que conseguem suportar a quebra pela RNaseH. Adaptado de (61)

Com a realização deste estudo concluíram que com a conceção dos dois LNAs e dos respetivos “gapmers”, a supressão da expressão do oncogene *BCR-ABL* é atingida mais rapidamente do que com o recurso a siRNA, sugerindo que esta diferença no tempo de resposta se reflita nos diferentes mecanismos de ação.

A potência dos “gapmers” concebidos para silenciar a proteína quimérica *bcr-abl* pode ser comparável à mesma obtida com o siRNA, ao nível da inibição da proteína, ativação da apoptose e redução da proliferação. Contudo, o possível uso de siRNA “in vivo”, e o seu possível uso terapêutico ainda se encontra limitado à pobre bioestabilidade em fluidos biológicos. Contrariamente as moléculas de LNA, sendo estáveis contra as nucleases, e contendo uma elevada afinidade para RNA, parecem ter as características importantes para se tornar agentes importantes para o tratamento do cancro.

Este grupo de investigação também colocou a hipótese de LNA-DNA “gapmers” ser usado em associação com o IM. Como os LNA-DNA são resistentes às nucleases e fortemente capazes de reduzir o nível de $p210^{BCR/ABL}$, o seu uso em combinação com o IM poderá reduzir a resistência a este fármaco. Estudos “in vitro” revelaram que o IM exibiu uma maior atividade antiproliferativa na presença de LNA-DNA. Assim, e apesar dos estudos “in vitro” nem sempre serem preditivos do que irá acontecer “in vivo”, este estudo mostrou que LNA-DNA isoladamente ou em combinação com o IM, pode ter potencial para futuramente ser usado no tratamento da LMC. (61)

4.5.2 Ribozimas

Outro método para inibir a expressão/atividade da oncoproteína *bcr-abl* é através da utilização de ribozimas específicas. As ribozimas são moléculas de RNA com capacidade autocatalítica, capazes de se associarem com outra molécula de RNA através do emparelhamento de bases e catalisar a hidrólise de ligações fosfodiéster específicas na sequência do RNA alvo. Até à data, vários tipos de ribozimas foram construídas para clivar outros RNAs, como por exemplo: Hammerhead (ribozima “em cabeça de martelo”), haripin (ribozima “em grampo de cabelo”) e ribozimas HDV (vírus da hepatite delta). As ribozimas conseguem separar sequências mutantes das do tipo selvagem correspondente, mesmo quando elas diferem apenas numa única base nucleotídica. (62)

A estrutura secundária da ribozima “Hammerhead” tem sido a mais bem descrita até à data. Esta ribozima é composta por duas regiões: um núcleo catalítico, que efetua a clivagem e duas sequências flanqueadoras que conferem a ligação e especificidade. A

ribozima pode inibir a expressão do gene alvo através de vários mecanismos que necessitam de investigação mais aprofundada. As ribozimas possuem atividade catalítica, bem como a capacidade de ligação ao RNA, para além da ativação da degradação pela RNase através do reconhecimento da dupla cadeia de RNA. (63)

Leopold *et al* mostraram redução no nível de bcr-abl mRNA, quando várias unidades de ribozimas foram transfectadas em mieloblastos murinos transformados com o gene *BCR-ABL* (32D células). A transfecção de múltiplas unidades de ribozima reduziu o nível de *BCR-ABL* mRNA 3 log. Estes resultados sugeriram que uma unidade multirribozima pode ser um agente terapêutico eficaz para o tratamento da LMC. (64)

4.5.3 RNA interferência

Desde a sua descoberta em 1998, o RNA de interferência (RNAi) tem revolucionado a investigação clínica. Pequenos RNAs, incluindo “small interfering” RNA (siRNAs), “short hairpin” RNA (shRNA) e “micro”RNA (miRNA), medeiam o mecanismo de silenciamento génico pós-transcricional, tornando-o numa potencial terapia molecular alvo dirigida com elevada especificidade, adaptabilidade e eficácia. O mecanismo de RNAi baseia-se no silenciamento da expressão de um gene específico através da clivagem das moléculas de RNA mensageiro (mRNA) codificadas por esse gene, inibindo deste modo a tradução da proteína correspondente. (65)

Assim, o RNA de dupla cadeia pode ser clivado em sequências curtas de dupla cadeia (21-23 nucleótidos) de RNA através de uma enzima denominada Dicer. Estas sequências ligam-se a quatro enzimas formando o complexo RISC (“RNA-induced silencing complex”). A cadeia antissense guia o complexo até ao mRNA alvo ao qual se liga, permitindo a sua clivagem por ação de endonucleases do complexo RISC. Contudo, à semelhança das limitações existentes nas estratégias antissense e ribozimas já referidas, esta estratégia de silenciamento apresenta também as mesmas limitações: a seletividade, a entrega, a estabilidade das moléculas de RNA de dupla cadeia em células de mamíferos, representam obstáculos significativos que têm vindo a tentar ser ultrapassados ao longo do tempo. Porém, estas estratégias de silenciamento continuam a ser estratégias bastante promissoras na área clínica. (63)

O uso da tecnologia do RNAi, através de um ponto de interrupção específico de RNAi, tem sido estudado para inibir seletivamente a proliferação celular dependente de bcr-

abl, bem como para aumentar o efeito do IM contra as células que expressam uma mutação resistente a este fármaco e células que sobre-expressam a proteína quimérica bcr-abl. (17)

Scherr *et al*, recorrendo ao uso desta tecnologia demonstraram que *BCR/ABL* mRNA foi reduzido até 87% em linhas celulares que sobre-expressam *BCR/ABL* e em células primárias de doentes com LMC. É necessário contudo, tentar encontrar um sistema de entrega eficaz de siRNA anti-*BCR/ABL* nas células leucémicas, sendo este o objetivo de vários grupos de investigação no decorrer dos anos. (66)

Na Tabela 5 encontram-se alguns estudos, que recorrem à utilização de siRNA e que demonstram o potencial desta estratégia.

Tabela 5. Exemplos de estratégias de silenciamento do mRNA de bcr-abl mediadas por RNAi.

Si BCR-ABL	
Autores	Investigação
Arthanari et al, (67)	shRNA e siRNA entregue por Tat-LK15 in K562 cells
Scherr et al, (66)	siRNA BCR-ABL em células leucémicas e em algumas linhas celulares.
Wohlbold, et al, (68)	siRNA BCR-ABL em células que sobreexpressam <i>BCR-ABL</i> e numa linha celular resistente ao IM (mutação His396Pro)
Koldehoff et al, (69)	siRNA BCR-ABL – 1ª aplicação “in vivo” recorrendo ao uso de transportadores sintéticos não virais (lipossomas catiónicos)
Mendonça et al, (70)	TrfR (recetor transferrina) “targeted” lipossomas que encapsulavam siRNA anti-BCR-ABL e IM – desenvolvimento de formulações lipossomais para entrega de siRNA anti-BCR-ABL e IM às células leucémicas.

Em fase de ensaio clínico encontra-se a ser desenvolvida uma nova metodologia que facilita o silenciamento específico de genes, que se baseia em pequenas moléculas de RNA que têm a função de reprimir especificamente a expressão do gene alvo. Trata-se do desenvolvimento de um modelo de terapia génica para o tratamento da LMC, recorrendo ao uso de partículas pseudovirais. Este estudo demonstrou que o tratamento com siRNA sintético inibiu o crescimento celular e aumentou a sensibilidade ao IM. Tais resultados oferecem a esperança de que uma nova forma de terapia génica, baseada nesta estratégia, pode melhorar o resultado do tratamento dos doentes com LMC, particularmente quando usada em combinação com um TKI, neste caso o IM. (71)

4.6 Estratégias para o bloqueio da oligomerização de BCR-ABL

Os tetrâmeros bcr-abl são oncogênicos, ao contrário dos monômeros bcr-abl. Para a ativação da proteína cinase bcr-abl é portanto necessária a tetramerização mediada pela região CC (“coiled coil”) N-terminal de bcr. O domínio CC é composto pela helix alfa 1 (aminoácidos 5-15) e pela helix alfa 2 (aminoácidos 28-67) que se encontram separadas por um loop flexível.

As primeiras indicações de que a inibição competitiva da tetramerização é uma abordagem promissora foram encontradas num estudo que demonstra que a coexpressão dos primeiros 160 a.a. de bcr (bcr 1-160) reduz o potencial de transformação de bcr-abl. (72)

Segundo Beissert *et al* em 2003, os primeiros 63 a.a. (bcr 63) são suficientes para a inibição da hétero-oligomerização de bcr-abl. (73) Em 2008, estes autores demonstraram que a interface de oligomerização das forças do domínio CC da região N-terminal de bcr além de interferir com o potencial de transformação da proteína quimérica bcr-abl também aumenta a sensibilidade para o IM. (74)

Mais recentemente, os mesmos autores realizaram um estudo que teve como objetivo o desenvolvimento de peptídeos inibitórios, de tamanho reduzido, permeáveis, que promovessem a rutura da tetramerização como aproximação terapêutica para leucemias Ph+, nomeadamente nos p185^{BCR/ABL} mutantes relacionados com a resistência ao IM. O perfil inibitório de MPH-2 (“tat-delivered helix-2 peptide”) suprimiu o crescimento de linhas celulares leucémicas dependentes de bcr-abl. Assim, MPH-2 pode fornecer a base para novos desenvolvimentos terapêuticos no tratamento da LMC. Como já referido, a inibição da tetramerização por MPH-2 inibe a atividade da cinase, independentemente da presença de mutações pontuais no domínio da cinase que conferem resistência ao IM. No entanto, p185^{BCR/ABL T3151} expresso em células hematopoiéticas não responde a MPH-2. (75)

Embora nenhuma das estratégias terapêuticas atuais para a LMC tenha como alvo o domínio de oligomerização de bcr-abl, esta abordagem pode ser explorada como ganho terapêutico numa terapia combinada com o IM.

5. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA A LMC

5.1 Vias de sinalização ativadas pela oncoproteína bcr-abl que podem constituir alvos terapêuticos para a LMC

Embora já tenham sido identificadas inúmeras vias de sinalização ativadas pela oncoproteína bcr-abl, tem sido difícil associar um único evento de sinalização a um efeito biológico específico. Para além disso, é de considerar a existência de redundância destas atividades.

Como já referido, a oncoproteína bcr-abl ativa cronicamente diversas vias de sinalização para conferir transformação maligna nas células hematopoiéticas, incluindo a PI3K, STATs e RAS. A indução de espécies reativas de oxigénio também tem sido estudada como crítica para essa transformação. Para ultrapassar a resistência ao IM, várias abordagens atuais aproveitam este facto para recorrer ao uso de fármacos que inibem estas vias de sinalização implicadas na transformação maligna das células hematopoiéticas, em vez de recorrerem aos inibidores de bcr-abl. Assim, todas estas vias de sinalização relacionadas com a oncoproteína bcr-abl, são bons alvos para se conseguir oferecer um efeito sinérgico antiproliferativo e pró-apoptótico quando combinados com o IM em células leucémicas.

Algumas destas estratégias, bem como alguns fármacos novos encontram-se resumidos na Figura 14. (17)

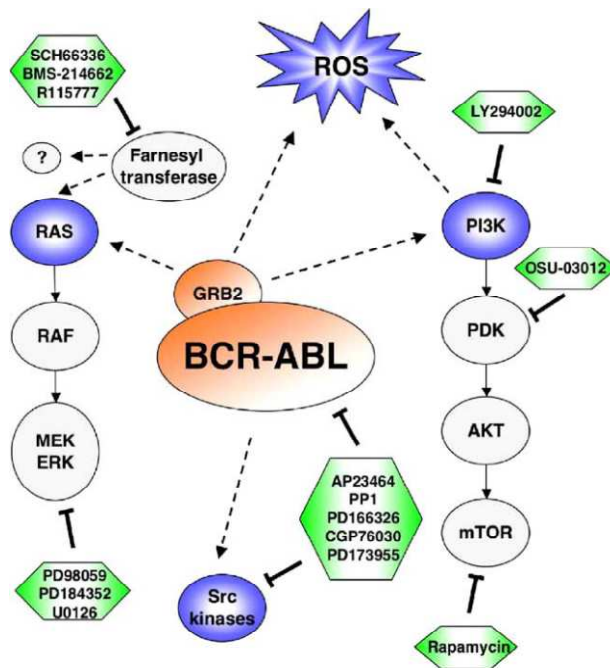


Figura 14 – Vias de sinalização implicadas na transformação maligna das células hematopoiéticas, ativadas pela oncoproteína bcr-abl que podem constituir alvos terapêuticos para a LMC. Por exemplo, a ativação de PI3K, RAS e espécies reativas de oxigênio (ROS) requer a autofosforilação de bcr-abl em Tyr177 e a ligação obrigatória a grb2. A ativação da família das src cinases também tem sido relacionada com o processo da doença desencadeado por bcr-abl. Alguns inibidores que atuam a estes níveis e outros que têm como alvo proteínas envolvidas nas vias de sinalização referidas encontram-se esquematicamente representados. Adaptado de (17)

A proteína bcr-abl encontra-se relacionada com a via de sinalização RAS através da interação proteína-proteína com os membros do complexo de sinalização RAS-MAPK. Esta via de sinalização encontra-se portanto ligada à oncoproteína bcr-abl através das moléculas adaptadoras grb2 (growth factor recetor-bound protein 2) e crkl, que são essenciais para a transformação oncogénica hematopoiética e dos fibroblastos. A inibição destas moléculas, através de inibidores da farnesil transferase (FTI – “farnesyl transferase inhibitor”) (Tabela 6), pode teoricamente reduzir essa transcrição nuclear. Dois inibidores da farnesil transferase: Tipifarnib (R115777; Johnson & Johnson Pharmaceutical) e Lonafarnib (SCH66336; Schering-Plough), têm demonstrado bons resultados quando aplicados na terapêutica da LMC. (76)

Tabela 6. FTI's em investigação clínica para o tratamento da LMC. (Clinical trials.gov, Acedido a 30/09/2012)

FTI's Promissores	
FTI's	Ensaio Clínico
RI15777 Tipifarnib (Zarnesta®)	Fase I - Tipifarnib+ Imatinib (LMC)
SCH6636 Lonafarnib(Sarasar®)	Fase II – Lonafarnib (LMC) ; Fase I completa– Lonafarnib + Imatinib
BMS-214662	Fase I – BMS-214662 (LMC)

Uma das principais vias de sinalização constitutivamente ativada pela oncoproteína bcr-abl e necessária para a sua transformação envolve a via PI3K e consequentemente os alvos seguintes nela envolvidos, nomeadamente a cinase serina/treonina akt, mtor e a cinase p70s6. Todos os membros envolvidos nesta via de sinalização têm um papel fundamental na regulação da sobrevivência e proliferação celular. Tem vindo a ser demonstrado que a ativação da via de sinalização PI3K/mTOR pela oncoproteína bcr-abl contribui para o aumento da produção das espécies reativas de oxigénio (ROS), ligando deste modo PI3K/mTOR a mecanismos que têm sido relacionados com a instabilidade genómica e a resistência ao IM. A tradução de sinal através desta via pode ser bloqueada através de inibidores como LY294002 ou Wortmanina, especificamente dirigidos a PI3K. A resposta celular à inibição de PI3K inclui a indução da apoptose e a inibição da proliferação celular. (1) Estes inibidores mostraram eficácia em linhas celulares resistentes ao IM (K562), através do aumento da sensibilidade ao IM, sugerindo que a resistência ao IM não confere resistência à inibição de PI3K neste modelo celular específico. (17)

O fármaco PRI-724 atualmente em Fase I/II de investigação clínica tem vindo a ser estudado em doentes com neoplasias mieloides em estado avançado. Trata-se de um fármaco que foi desenhado com o objetivo de bloquear a via de sinalização WNT necessária para as células tumorais proliferarem e metastizarem. (77)

Também na fase I/II de investigação clínica está o IM em associação com o RAD001 (Everolimus – via mTOR), em doentes com LMC Fase Crónica, com o objetivo de conseguir destruir as células estaminais leucémicas. (78)

5.2 Desenvolvimento de vacinas para a LMC

O sistema imunitário é um importante mecanismo de defesa contra as doenças. Têm sido observados bons resultados no contexto da prevenção de infeções, enquanto que o uso terapêutico do sistema imunitário tem sido menos bem sucedido. O que é particularmente visível no cancro, onde algumas décadas de estudo intensivo nesta área têm até agora poucos benefícios na prática clínica. A considerável heterogeneidade do cancro, bem como o incompleto conhecimento da imunidade têm vindo a dificultar o desenvolvimento de terapias na área da imunologia para o cancro, apesar de existirem já alguns avanços nesta área, nomeadamente citoquinas como o INF- α na LMC, bem como o transplante de medula óssea em diversos tipos de leucemia.

A LMC é um protótipo de terapia imunológica do cancro em humanos. A biologia molecular, bem como a fisiopatologia desta doença encontram-se mais bem estudadas até à data comparativamente com outros tipos de cancros, o que de certa forma também contribui para este facto. As células leucémicas expressam um ou mais antigénios tumorais específicos caracterizados até então: sequências específicas que abrangem o produto do gene *BCR-ABL*.

O fator de transcrição WT-1 (“*The Wilms tumor protein*” *WT-1*) encontra-se expresso nos tecidos normais durante o desenvolvimento embrionário. Na LMC a sua sobre-expressão encontra-se também identificada. O uso de WT-1 como alvo para a vacinação contra LMC WT-1 positivo surge como uma estratégia promissora que continua a ser estudada neste sentido. (79)

A progressão da LMC é acompanhada de anormalidades genéticas adicionais, presumíveis anormalidades específicas individuais que sugerem o funcionamento das vacinas autólogas nesta patologia. Várias estratégias neste sentido continuam a ser exploradas como por exemplo vacinas de células dendríticas autólogas com ou sem tradução do gene GM-CSF, ou vacinas de proteínas Heat shock autólogas direcionadas a possíveis antigénios específicos de cada doente. (79)

Nos últimos anos uma série de vacinas de DNA têm sido desenvolvidas, com base em diferentes aspetos, para atingir as células leucémicas.

Lucansky *et al.* demonstraram que os plasmídeos que transportam o gene de fusão *BCR-ABL* quer completo, quer apenas um fragmento do gene, que codifica para uma zona de junção de 25 a.a. (*BCR-ABL* 25 aa) ligada com os genes que codificam para uma variedade de fatores imunoestimuladores, foram utilizados como vacinas de DNA em ratinhos. (80)

Vacinas peptídicas derivadas da sequência de a.a. que cruza com o “breakpoint” de fusão do gene b3a2 provaram a sua eficácia em doentes com LMC Fase Crónica. Estas vacinas provocam respostas restritas dos linfócitos T citotóxicos classe I e II. (81)

Uma equipa de investigação do *Johns Hopkins Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center* realizou testes preliminares que indicam que uma vacina feita com células leucémicas pode reduzir ou mesmo eliminar as células cancerígenas residuais, em alguns doentes com LMC que estejam a tomar o IM. Num estudo piloto publicado no *Clinical Cancer Research*, os investigadores usaram uma vacina feita a partir de células da LMC, irradiadas para travar o seu potencial cancerígeno e geneticamente alteradas para produzir um estimulador do sistema imunitário, GM-CSF. As células tumorais também transportavam antígenos específicos para células da LMC, que sensibilizavam o sistema imunitário a reconhecer e matar as células leucémicas circulantes.(82)

Atualmente em fase de ensaio clínico encontram-se inúmeras vacinas promissoras no combate à resistência do IM na LMC. Na tabela seguinte (Tabela 7) estão descritos alguns desses ensaios clínicos.

Tabela 7. Vacinas em fase de investigação clínica para o tratamento da LMC. (Clinical trials.gov, Acedido a 30/09/2012)

Vacina	Patrocinador	Investigação	Fase
Vacina multipeptídica bcr-abl	Tehran University of Medical Sciences	LMC em doentes que recebem tratamento com o IM	Fase I
Vacina com a proteína WT1	National Cancer Institute (NCI)	LMC, Leucemia Linfocítica Aguda, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome mielodisplásica, Linfoma Não Hodgkin	Fase I/ II
Vacina GVAX obtida a partir das células leucémicas dos doentes envolvidos na investigação	Dana-Farber Cancer Institute, com a colaboração de Brigham and Women's Hospital	LMC CB refractária, Leucemia Mieloide Aguda refractária e Síndrome Mielodisplásica RAEB-I ou RAEB-II	Fase II
Vacina peptídica (partes de proteínas presentes nas células estaminais dos doentes estudados) + GM-CSF	National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)	LMC, Síndrome Mielodisplásico, Leucemia Mieloide Aguda	Fase II
Vacina peptídica sintética + IM	M.D. Anderson Cancer Center	LMC (doença mínima residual)	Fase II
Vacina peptídica bcr-abl	OHSU Knight Cancer Institute, com a colaboração de National Cancer Institute (NCI)	LMC FC	Fase II
Vacina GM-K562 + IM	Dana-Farber Cancer Institute, com a colaboração de Beth Israel Deaconess Medical Center e NCI	LMC FC	Fase I
Vacina peptídica derivada de WT1	Michael Morse, MD	LMC, Leucemia Linfocítica Aguda, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome mielodisplásica	Fase I
Vacina obtida de HSP70 do tumor de cada doente	University of Connecticut	LMC FC	Fase I

CONCLUSÃO

Com este trabalho pretendeu-se rever e analisar o estado da arte dos tipos de resistência ao IM na LMC, bem como o estado da arte das estratégias mais importantes que se encontram a ser desenvolvidas com o objetivo de ultrapassar esta resistência na LMC.

O IM foi o primeiro inibidor da tirosina cinase utilizado na prática clínica tornando-se rapidamente na primeira linha de tratamento para a LMC. Contudo, uma parte dos doentes é à partida resistente ao fármaco e outra parte acaba por adquirir resistência no decurso do tratamento. Deste modo e apesar do inicialmente previsto, o IM não é um tratamento efetivo para a cura da LMC, tornando-se por isso fundamental o estudo e compreensão dos mecanismos responsáveis pela resistência.

Inicialmente, a aquisição de resistência ao IM foi associada ao restabelecimento da atividade da tirosina cinase bcr-abl por intermédio de mecanismos que impediam a ligação do IM à proteína. Nesta fase, foram descritos como mecanismos de resistência a aquisição de mutações pontuais no domínio da oncoproteína bcr-abl, a sobre-expressão de transportadores membranares e a sobre-expressão de bcr-abl. Mais tarde surgiram evidências de que a resistência pode ocorrer não só em consequência da recuperação da atividade da proteína cinase, mas também pela expansão clonal de células que possuem alterações em vias de transdução de sinal, que lhes permitem sobreviver independentemente da atividade da cinase bcr-abl.

A crescente expansão do conhecimento, acerca dos diferentes mecanismos de resistência ao IM, tem vindo a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias que atuam a vários níveis e tem como objetivo superar a resistência ao IM que comumente atinge os doentes com LMC inicialmente sensíveis a este fármaco. O desenvolvimento de novas gerações de TKI's, bem como o desenvolvimento de novos fármacos inibidores de múltiplas cinases e associações de fármacos tem vindo a aumentar com o decorrer dos anos. São muitos os fármacos bastante promissores em fase de ensaio clínico que prometem atingir a prática clínica e ter sucesso nesta patologia. Salientam-se os inibidores da tirosina cinase de terceira geração, apresentados como estratégias bastante promissoras no combate à resistência do IM, dos quais se destaca o Ponatinib (AP24534) e o Rebastinib (DCC2036) que têm vindo a demonstrar resultados satisfatórios contra o mutante T135I.

A decisão terapêutica ideal, principalmente em pesquisas futuras acerca do tratamento de primeira linha na LMC, passará pela identificação do tipo de resistência. Concretamente se a resistência é um fenômeno adquirido com o decorrer da terapêutica, ou uma característica pré-estabelecida da patologia. No entanto, até que tal seja clarificado, outras opções terapêuticas para doentes resistentes ao IM são necessárias e continuam a ser uma área de investigação intensiva.

É notória a existência de muitas publicações científicas que mostram a presença de uma ampla evidência genética de que a oncoproteína bcr-abl não é apenas necessária, mas também suficiente para a transformação das células hematopoiéticas. Portanto a própria oncoproteína bcr-abl é considerada um alvo atraente para o desenho de estratégias que visam o combate da resistência ao IM. São várias as diferentes abordagens para atingir bcr-abl: reduzir os níveis de bcr-abl mRNA ou bloquear a sua tradução através do siRNA, asODN ou ribozimas, bem como alterar a estabilidade da proteína através da ligação de moléculas inibidoras.

Na última década, as estratégias de silenciamento do mRNA da oncoproteína bcr-abl, quer através de asODN, quer de ribozimas ou siRNA, com o objetivo de suprimir a expressão do oncogene *BCR-ABL* nas células leucémicas têm recebido especial atenção por parte de alguns grupos de investigação. Já alguns oligonucleotídeos antisense atingiram a fase de ensaios clínicos, sendo uma abordagem bastante promissora.

O uso da tecnologia do RNAi, através de um ponto de interrupção específico de RNAi, tem sido estudado para inibir seletivamente a proliferação celular dependente de bcr-abl, bem como para aumentar o efeito do IM contra as células que expressam uma mutação resistente a este fármaco e células que sobreexpressam a proteína quimérica bcr-abl.

A tecnologia do RNAi tem demonstrado ser ainda superior às estratégias antissense convencionais, devido à elevada estabilidade de siRNAs, bem como à eficácia do processo de silenciamento que conseguem induzir. Inúmeros estudos estão a ser realizados neste sentido, sendo esta uma estratégia bastante promissora que se perspectiva futuramente poder vir a alcançar a prática clínica, sendo para isso necessário ultrapassar as dificuldades destas tecnologias de silenciamento de genes em humanos.

O desenvolvimento de vacinas, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos para a LMC presentes nas diversas vias de sinalização ativadas pela oncoproteína bcr-abl são também dois temas abordados neste trabalho. Destaca-se o fármaco PRI-724, que tem vindo a ser estudado em doentes com neoplasias mieloides em estado avançado e que, foi desenhado com o objetivo de bloquear a via de sinalização WNT necessária para as células tumorais proliferarem e metastizarem. Evidencia-se também a combinação terapêutica do IM com o Everolimus (RAD001-via mTOR), em doentes com LMC Fase Crónica, que tem como objetivo a destruição das células estaminais leucémicas e já se encontra numa fase avançada de investigação clínica tendo vindo a apresentar resultados satisfatórios.

Atualmente em fase de ensaio clínico encontram-se inúmeras vacinas promissoras no combate à resistência do IM na LMC.

É curioso e interessante observar o crescente desenvolvimento dos contributos para o conhecimento da biologia molecular da LMC, bem como do tratamento da mesma. Desde o aparecimento do IM que têm vindo a ser desenvolvidas novas abordagens terapêuticas para o tratamento desta patologia. Algumas das quais já se encontram atualmente disponíveis, outras em fase de investigação clínica e que têm como objetivo ultrapassar a resistência ao IM.

É uma área bastante interessante e promissora que tem vindo a ser alvo de estudo. Embora necessite de contínua pesquisa, promete alcançar resultados favoráveis, esperando-se que todos os compostos em fase de ensaio clínico consigam realmente alcançar a prática clínica, sendo uma mais-valia para os doentes que sofrem desta patologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1). VAIDYA, S.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. - **Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review.** Eur J Haematol, Vol.87,n° 5 (2011): p. 381-93.
- (2). PERROTTI, D., et al. - **Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation.** J Clin Invest, Vol.120,n° 7 (2010): p. 2254-64.
- (3). PILLER, G. - **Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950.** Br J Haematol, Vol.112,n° 2 (2001): p. 282-92.
- (4). DALEY, G. Q.; VAN ETTEN, R. A.; BALTIMORE, D. - **Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome.** Science, Vol.247,n° 4944 (1990): p. 824-30.
- (5). KANTARJIAN, H. M., et al. - **New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance.** Ann Intern Med, Vol.145,n° 12 (2006): p. 913-23.
- (6). WU, X.; HABER, J. E. - **Cutting and pasting chromosomes in vivo.** Trends Cell Biol, Vol.7,n° 2 (1997): p. 48.
- (7). NOWELL, P. C. - **Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective.** J Clin Invest, Vol.117,n° 8 (2007): p. 2033-5.
- (8). DEININGER, M. W.; DRUKER, B. J. - **Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib.** Pharmacol Rev, Vol.55,n° 3 (2003): p. 401-23.
- (9). DRUKER, B. J. - **Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML.** Blood, Vol.112,n° 13 (2008): p. 4808-17.
- (10). FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. - **Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century.** Ulster Med J, Vol.76,n° 1 (2007): p. 8-17.
- (11). PANE, F., et al. - **BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations.** Oncogene, Vol.21,n° 56 (2002): p. 8652-67.
- (12). QUINTAS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H. M.; CORTES, J. E. - **Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia.** Cancer Control, Vol.16,n° 2 (2009): p. 122-31.
- (13). INOKUCHI, K. - **Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies.** J Nippon Med Sch, Vol.73,n° 4 (2006): p. 178-92.
- (14). LITZOW, M. R. - **Imatinib resistance: obstacles and opportunities.** Arch Pathol Lab Med, Vol.130,n° 5 (2006): p. 669-79.

- (15). HAZLEHURST, L. A., et al. - **Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation**. *Cancer Control*, Vol.16,n° 2 (2009): p. 100-7.
- (16). KANTARJIAN, H. M., et al. - **Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia**. *Clin Cancer Res*, Vol.13,n° 4 (2007): p. 1089-97.
- (17). WALZ, C.; SATTLER, M. - **Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)**. *Crit Rev Oncol Hematol*, Vol.57,n° 2 (2006): p. 145-64.
- (18). HUNTER, T. - **Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib**. *J Clin Invest*, Vol.117,n° 8 (2007): p. 2036-43.
- (19). STEELMAN, L. S., et al. - **JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis**. *Leukemia*, Vol.18,n° 2 (2004): p. 189-218.
- (20). DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. - **Cellular survival: a play in three Acts**. *Genes Dev*, Vol.13,n° 22 (1999): p. 2905-27.
- (21). MELO, J. V.; BARNES, D. J. - **Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer**. *Nat Rev Cancer*, Vol.7,n° 6 (2007): p. 441-53.
- (22). SKORSKI, T. - **BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability**. *Oncogene*, Vol.21,n° 56 (2002): p. 8591-604.
- (23). BACCARANI, M., et al. - **Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet**. *Blood*, Vol.108,n° 6 (2006): p. 1809-20.
- (24). HEHLMANN, R., et al. - **Chronic myeloid leukaemia**. *Lancet*, Vol.370,n° 9584 (2007): p. 342-50.
- (25). HENKES, M.; VAN DER KUIP, H.; AULITZKY, W. E. - **Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevec trademark)**. *Ther Clin Risk Manag*, Vol.4,n° 1 (2008): p. 163-87.
- (26). KANTARJIAN, H. M., et al. - **Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis**. *Cancer*, Vol.97,n° 4 (2003): p. 1033-41.
- (27). MAURO, M. J.; DRUKER, B. J. - **STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML**. *Oncologist*, Vol.6,n° 3 (2001): p. 233-8.
- (28). SHEN, T., et al. - **Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10)**. *PLoS One*, Vol.4,n° 10 (2009): p. e7520.

- (29). HOCHHAUS, A. - **Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors.** Ann Oncol, Vol.17 Suppl 10,n° (2006): p. x274-9.
- (30). APPERLEY, J. F. - **Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia.** Lancet Oncol, Vol.8,n° 11 (2007): p. 1018-29.
- (31). SCHINDLER, T., et al. - **Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.** Science, Vol.289,n° 5486 (2000): p. 1938-42.
- (32). GORRE, M. E., et al. - **Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification.** Science, Vol.293,n° 5531 (2001): p. 876-80.
- (33). BIXBY, D.; TALPAZ, M. - **Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, n° (2009): p. 461-76.
- (34). MELO, J. V.; CHUAH, C. - **Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia.** Cancer Lett, Vol.249,n° 2 (2007): p. 121-32.
- (35). MAHON, F. X., et al. - **Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance.** Blood, Vol.96,n° 3 (2000): p. 1070-9.
- (36). WIDMER, N., et al. - **Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels.** Leukemia, Vol.21,n° 7 (2007): p. 1561-2; author reply 1562-4.
- (37). CHE, X. F., et al. - **Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a newly synthesized 1,4-benzothiazipine derivative, JTV-519.** Cancer Lett, Vol.187,n° 1-2 (2002): p. 111-9.
- (38). KOTAKI, M., et al. - **Anti-proliferative effect of the abl tyrosine kinase inhibitor STI571 on the P-glycoprotein positive K562/ADM cell line.** Cancer Lett, Vol.199,n° 1 (2003): p. 61-8.
- (39). BIXBY, D.; TALPAZ, M. - **Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia.** Leukemia, Vol.25,n° 1 (2011): p. 7-22.
- (40). LANGE, T., et al. - **High levels of BAX, low levels of MRP-1, and high platelets are independent predictors of response to imatinib in myeloid blast crisis of CML.** Blood, Vol.101,n° 6 (2003): p. 2152-5.
- (41). GALIMBERTI, S., et al. - **Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment.** Cancer Genet Cytogenet, Vol.162,n° 1 (2005): p. 57-62.

- (42). WHITE, D. L., 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, Vol.110,n° 12 (2007): p. 4064-72.
- (43). ZIMMERMAN, E. I., et al. - **Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression: implications for drug resistance in myelogenous leukemia.** Mol Pharmacol, Vol.78,n° 5 (2010): p. 811-7.
- (44). DONATO, N. J., et al. - **BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571.** Blood, Vol.101,n° 2 (2003): p. 690-8.
- (45). MUGHAL, T., et al. - **Chronic myeloid leukemia--some topical issues.** Leukemia, Vol.21,n° 7 (2007): p. 1347-52.
- (46). CARTER, B. Z., et al. - **The elusive chronic myeloid leukemia stem cell: does it matter and how do we eliminate it?** Semin Hematol, Vol.47,n° 4 (2010): p. 362-70.
- (47). LAHAYE, T., et al. - **Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up.** Cancer, Vol.103,n° 8 (2005): p. 1659-69.
- (48). VALENT, P. - **Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches.** Biologics, Vol.1,n° 4 (2007): p. 433-48.
- (49). TALPAZ, M., et al. - **Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias.** N Engl J Med, Vol.354,n° 24 (2006): p. 2531-41.
- (50). SHAH, N. P., et al. - **Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor.** Science, Vol.305,n° 5682 (2004): p. 399-401.
- (51). O'HARE, T., et al. - **Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia.** Clin Cancer Res, Vol.17,n° 2 (2011): p. 212-21.
- (52). ZHANG, B., et al. - **Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate.** Cancer Cell, Vol.17,n° 5 (2010): p. 427-42.
- (53). BURCHERT, A., et al. - **Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia.** J Clin Oncol, Vol.28,n° 8 (2010): p. 1429-35.
- (54). APPERLEY, J. F. - **Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia.** Lancet Oncol, Vol.8,n° 12 (2007): p. 1116-28.

- (55). LIMA, R., ET AL - **Overcoming K562Dox resistance to STI571 (Gleevec) by downregulation of P-gp expression using siRNAs**. *Cancer Therapy*, Vol.5,n° (2007): p. 67-76.
- (56). CROSSMAN, L. C., et al. - **hOCT 1 and resistance to imatinib**. *Blood*, Vol.106,n° 3 (2005): p. 1133-4; author reply 1134.
- (57). THOMAS, J., et al. - **Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance**. *Blood*, Vol.104,n° 12 (2004): p. 3739-45.
- (58). INSTITUTE, N. C. - **17-N-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Treating Patients With Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia That Did Not Respond to Imatinib Mesylate**. Acedido a: 10.11.2012; Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00100997?term=17-N-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin+in+Treating+Patients+With+Chronic+Phase+Chronic+Myelogenous+Leukemia+That+Did+Not+Respond+to+Imatinib+Mesylate&rank=1>.
- (59). DEAN, N. M.; BENNETT, C. F. - **Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer**. *Oncogene*, Vol.22,n° 56 (2003): p. 9087-96.
- (60). DIAS, N.; STEIN, C. A. - **Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms**. *Mol Cancer Ther*, Vol.1,n° 5 (2002): p. 347-55.
- (61). RAPOZZI, V.; COGOI, S.; XODO, L. E. - **Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells**. *Mol Cancer Ther*, Vol.5,n° 7 (2006): p. 1683-92.
- (62). SCHERER, L. J.; ROSSI, J. J. - **Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA**. *Nat Biotechnol*, Vol.21,n° 12 (2003): p. 1457-65.
- (63). SCANLON, K. J. - **Anti-genes: siRNA, ribozymes and antisense**. *Curr Pharm Biotechnol*, Vol.5,n° 5 (2004): p. 415-20.
- (64). LEOPOLD, L. H., et al. - **Multi-unit ribozyme-mediated cleavage of bcr-abl mRNA in myeloid leukemias**. *Blood*, Vol.85,n° 8 (1995): p. 2162-70.
- (65). MEISTER, G.; TUSCHL, T. - **Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA**. *Nature*, Vol.431,n° 7006 (2004): p. 343-9.
- (66). SCHERR, M., et al. - **Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA**. *Blood*, Vol.101,n° 4 (2003): p. 1566-9.
- (67). ARTHANARI, Y., et al. - **Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells**. *J Control Release*, Vol.145,n° 3 (2010): p. 272-80.

- (68). WOHLBOLD, L., et al. - ***Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571)***. Blood, Vol.102,n° 6 (2003): p. 2236-9.
- (69). KOLDEHOFF, M., et al. - ***Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia***. Clin Exp Med, Vol.7,n° 2 (2007): p. 47-55.
- (70). MENDONCA, L. S., et al. - ***Co-encapsulation of anti-BCR-ABL siRNA and imatinib mesylate in transferrin receptor-targeted sterically stabilized liposomes for chronic myeloid leukemia treatment***. Biotechnol Bioeng, Vol.107,n° 5 (2010): p. 884-93.
- (71). ORGANIZATION, H. M. - ***Use of SV40 Vectors to Treat Chronic Myeloid Leukemia (CML)***. Acedido a: 01.12.12; Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00257647?term=Vector+SV40&rank=1>.
- (72). GUO, X. Y., et al. - ***Peptide containing the BCR oligomerization domain (AA 1-160) reverses the transformed phenotype of p210bcr-abl positive 32D myeloid leukemia cells***. Oncogene, Vol.17,n° 7 (1998): p. 825-33.
- (73). BEISSERT, T., et al. - ***Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface of BCR interferes with the transformation potential of BCR-ABL and increases sensitivity to STI571***. Blood, Vol.102,n° 8 (2003): p. 2985-93.
- (74). BEISSERT, T., et al. - ***Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface by a helix-2 peptide inhibits unmutated and imatinib-resistant BCR/ABL***. Int J Cancer, Vol.122,n° 12 (2008): p. 2744-52.
- (75). BEISSERT, T., ET AL. - ***Targeting the Oligomerization of BCR/ABL by Membrane Permeable Competitive Peptides Inhibits the Proliferation of Philadelphia Chromosome Positive Leukemic Cells***. The Open Hematology Journal, Vol.5,n° (2011): p. 21-27.
- (76). MELO, J. V.; CHUAH, C. - ***Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond***. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, n° (2008): p. 427-35.
- (77). PRISM PHARMA CO., L. - ***Safety and Efficacy Study of PRI-724 in Subjects With Advanced Myeloid Malignancies***. Acedido a: 09.2012; Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01606579?term=Safety+and+Efficacy+Study+of+PRI-724+in+Subjects+With+Advanced+Myeloid+Malignancies&rank=1>.
- (78). CENTER, U. O. M. C. - ***RAD001 in Patients With Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia w/ Molecular Disease***. Acedido a: 12.2012; Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01188889?term=RAD001+in+Patien>

ts+With+Chronic+Phase+Chronic+Myeloid+Leukemia+w%2F+Molecular+Disease.&rank=1.

- (79). JUNIA V. MELO, J. M. G. - ***Hematologic Malignancies: Myeloproliferative Disorders***, S.B. Heidelberg, Editor 2007. p. 185-198.
- (80). LUCANSKY, V., et al. - ***DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice***. Int J Oncol, Vol.35,n° 4 (2009): p. 941-51.
- (81). PINILLA-IBARZ, J., et al. - ***Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses***. Blood, Vol.95,n° 5 (2000): p. 1781-7.
- (82). SMITH, B. D., et al. - ***K562/IGM-CSF immunotherapy reduces tumor burden in chronic myeloid leukemia patients with residual disease on imatinib mesylate***. Clin Cancer Res, Vol.16,n° 1 (2010): p. 338-47.