

Sofia Vanessa Rodrigues Martins

Cromossoma *Philadelphia* e leucemia: biologia e terapêutica

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sofia Vanessa Rodrigues Martins

Cromossoma *Philadelphia* e leucemia: biologia e terapêutica

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sofia Vanessa Rodrigues Martins, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2011146658, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 12 de julho de 2016

O Aluno,

(Sofia Vanessa Rodrigues Martins)

A Orientadora,

(Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes)

O Aluno,

(Sofia Vanessa Rodrigues Martins)

AGRADECIMENTOS

Momentos que passam, saudades que ficam...

Inevitavelmente, deparo-me com o momento da partida, momento nostálgico este que me faz olhar para trás no tempo e recordar todos os sorrisos, todas as lágrimas, toda a partilha e união que me faz ter a certeza de que a essência e magia de todo este percurso académico esteve, não só, presente na cidade e toda a tradição envolvente, mas, e mais importante, em todas as pessoas com quem partilhei momentos únicos que contribuíram para o meu crescimento e, certamente, ficarão guardados para sempre como os melhores anos da minha vida...Os “verdes” anos!

Assim, é impossível terminar esta etapa da minha vida sem agradecer àqueles que tornaram todo este caminho, além de, possível, concretizável.

Um sincero obrigada à Phartuna, a Tuna de Farmácia de Coimbra que me acolheu de uma forma inexplicável, sendo ela e todos aqueles que cruzaram o meu caminho nesta instituição, os maiores responsáveis pelo meu desenvolvimento pessoal e pelos melhores momentos que passei, estes cinco anos, nesta Academia.

Quero também agradecer aos meus amigos que, sem dúvida alguma, foram e serão para sempre, a família que eu escolhi nesta, que foi, a minha vida académica. À Inês, que apesar da amizade improvável, foi e é o grande pilar de todas as horas e de todos os momentos que tornaram cada sorriso numa prova de eterna amizade. À Camila, à Rita e à Catarina que, com toda a certeza, foram as melhores companheiras de “guerra” na amizade, compreensão, apoio e paciência, em todos os lugares e em todas as experiências partilhadas, que fizeram com que a união mostrasse o verdadeiro valor dos obstáculos.

À Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes, orientadora da minha Monografia, um muito obrigada pelos conselhos, pela paciência e por toda a sua disponibilidade.

Por fim, e não menos importante, um eterno agradecimento aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós, que mostram, todos os dias, que apesar dos obstáculos que, involuntariamente, surgem nas nossas vidas, a força que persiste faz tornar o improvável num caminho cada vez mais alcançável.

“...Nós, os profissionais de saúde, devemos ser vendedores de sonhos, pois se conseguirmos fazer com que os nossos doentes possam sonhar, ainda que seja com mais um dia de vida ou com uma nova maneira de ver as suas perdas, encontraremos um tesouro que os reis não conquistaram...”

Augusto Cury

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMO.....	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. HEMATOPOIESE	2
3. LEUCEMIA: DEFINIÇÃO GERAL.....	3
4. LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA (LMC) E CROMOSSOMA <i>PHILADELPHIA</i>	3
4.1. SINAIS E SINTOMAS.....	4
4.2. CROMOSSOMA <i>PHILADELPHIA</i> (<i>PH</i>): PATOGÉNESE MOLECULAR	4
4.3. DIAGNÓSTICO	6
4.3.1. ENSAIOS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO E CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA À TERAPÊUTICA	7
5. TERAPÊUTICA.....	9
5.1. EVOLUÇÃO DA TERAPÊUTICA	10
5.2. INIBIDORES DE TIROSINA CINASE (<i>TKIS</i>).....	10
5.2.1. INIBIDORES DE TIROSINA CINASE DE SEGUNDA GERAÇÃO E TERCEIRA GERAÇÃO 12	
6. EFEITOS ADVERSOS DOS INIBIDORES DE TIROSINA CINASE.....	16
7. CONCLUSÕES	16
8. BIBLIOGRAFIA	18

LISTA DE ABREVIATURAS

ABLI- *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*

ATP- *Adenosine Triphosphate*

BCR- *Breakpoint Cluster Region*

CB – Crise Blástica

c-KIT-tipo de recetor da tirosina cinase

CRKL- proteína associada a CRK

ELN- *European Leukemia Net*

FA – Fase Acelerada

FC – Fase Crónica

FDA-*Food and Drug Administration (EUA)*

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

G.I- *Gastrointestinais*

GRB-2-*Growth factor receptor-bound protein 2*

LMC – *Leucemia Mieloide Crónica*

MAPK- *Proteína cinase ativada por mitogénios*

M-bcr – *Major breakpoint cluster region*

m-bcr – *Minor breakpoint cluster region*

mRNA-*messenger Ribonucleic Acid*

NK- *Natural killer cells*

OMS- *Organização Mundial de Saúde*

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

Ph – *Cromossoma Filadélfia (Philadelphia Chromosome)*

PI3K– *Phosphatidylinositol 3-kinase*

RAS – *Rat Sarcoma*

RC- *Resposta citogenética*

RCC- *Resposta citogenética completa*

RH- *Resposta Hematológica*

RHC- *Resposta Hematológica Completa*

RHM- *Resposta Hematológica Major*

RM- *Resposta molecular*

RMC- *Resposta molecular completa*

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

START- Src/abl Tyrosine kinase inhibition Activity Research Trials of dasatinib

STAT- Transdutores de sinal e ativadores da transcrição

TKI – Inibidor da tirosina cinase

μ -bcr – *Micro breakpoint cluster region*

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia caracterizada por uma translocação cromossômica específica, entre os cromossomas 9 e 22(cromossoma *Philadelphia*), resultando desta translocação cromossômica, a proteína *bcr-abl*. Esta neoplasia se não for tratada antecipadamente evolui, rapidamente, de uma fase crônica para uma fase acelerada, terminando em crise blástica.

Nas últimas décadas, a terapêutica desta doença tem evoluído no sentido de melhorar e contrariar as falhas que têm surgido nos doentes submetidos a tratamento, nomeadamente, os efeitos adversos e a resistência aos fármacos.

Este trabalho pretende, não só abordar a biologia da doença e os seus métodos de diagnóstico, mas, também, apresentar, com base na literatura atual, as várias linhas terapêuticas e avaliá-las em termos de eficácia, tolerância, resposta e resistência. Assim, nesta monografia, destaca-se o papel dos inibidores de tirosina cinase, bem como as estratégias de tratamento a eles associados, de modo a identificar novos alvos terapêuticos.

Palavras chave: Leucemia Mielóide Crônica; *BCR-ABL*; inibidores de tirosina cinase; imatinib; terapêutica.

ABSTRACT

Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a neoplasia characterized by a specific chromosomal translocation between chromosomes 9 and 22(Philadelphia chromosome), resulting from this chromosomal translocation, the bcr-abl protein. This disease, if not treated early, it evolves rapidly, from chronic phase to an accelerated phase, ending in blast crisis.

In recent decades, the therapy of this disease has evolved to improve and to counter the shortcomings that have arisen in patients undergoing treatment, in particular, the adverse effects and the drug resistance.

This work aims, not only to address the biology of the disease and its diagnostic methods, but also present, based on the current literature, several therapeutic lines and evaluate them in terms of efficacy, tolerance, response and resistance. Thus, in this monograph, it highlights the role of tyrosine kinase inhibitors, as well as, the treatment strategies associated with them to identify new therapeutic targets.

Keywords: *Chronic Myeloid Leukemia; BCR-ABL; tyrosine kinase inhibitors; imatinib; therapy.*

I. INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Crónica(LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa resultante da atividade da tirosina cinase *bcr-abl* e caracterizada por uma translocação cromossômica da qual resulta o cromossoma *Philadelphia*. Normalmente os doentes que apresentam esta neoplasia não manifestam sintomatologia, porém podem surgir sintomas constitucionais e, até mesmo, problemas mais acentuados, que surgem com a progressão da doença.

Em termos de incidência, esta doença constitui um quinto de todos os casos de leucemia nos Estados Unidos da América, sendo diagnosticada em 1 ou 2 pessoas em 100.000 por ano, e tem uma ligeira preponderância no sexo masculino. Esta incidência de 4800 a 5000 casos por ano não mudou, significativamente, nas últimas décadas, e fatores como a idade (\approx 50-55 anos) podem aumentar esta incidência.⁸

Em Portugal, esta patologia representa cerca de 15-20% de todas as leucemias e a sua incidência é de 1-1,5 casos por 100.000 habitantes/ano. Ocorre mais frequentemente em adultos e a idade média em que esta patologia é diagnosticada é aos 50 anos. É mais comum nos homens do que nas mulheres e não é uma doença hereditária ou de predomínio familiar.³

A sua etiologia é ainda desconhecida e apenas foi descrito um único fator de risco conhecido: a exposição a radiação ionizante.⁸

A terapêutica implementada no tratamento deste tipo de leucemia tem evoluído no sentido de se conseguir alcançar a melhor resposta, de modo a evitar a progressão da mesma. Os inibidores de tirosina cinase (*TKIs*) constituem, até ao momento, a terapêutica preferencial e mais adequada, tendo-se verificado, cada vez mais, um ganho de potencial nos inibidores de segunda geração e de terceira geração, comparativamente à terapêutica de primeira linha, na qual têm sido descritos vários casos de resistência e efeitos adversos.

Assim, têm surgido novas abordagens terapêuticas, que se encontram, ainda, em fase de ensaio clínico e que se apresentam como estratégias bastante promissoras relativamente ao sucesso que pode ser alcançado, eliminando falhas existentes nas terapêuticas já implementadas.

2. HEMATOPOIESE

A hematopoiese define-se como o processo de formação de diversas células sanguíneas, e é efetuado essencialmente na medula óssea e, em menor grau, em alguns órgãos pertencentes ao sistema imunitário (baço e gânglios linfáticos). (Figura 1)

A célula precursora da série mielóide (mielóide *stem cell*) diferencia-se em três tipos de células maduras:⁴

- Glóbulos vermelhos que transportam oxigénio e outras substâncias para todos os tecidos do corpo.
- Plaquetas que participam na coagulação sanguínea.
- Granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), que atuam no combate a infeções e em algumas doenças.

A célula precursora da série linfóide diferencia-se em três tipos de linfócitos:⁴

- Linfócitos B que produzem anticorpos para ajudar a combater a infecção.
- Linfócitos T que atuam na imunidade celular “auxiliam” os linfócitos B.
- Células NK (*Natural Killer*) que “atacam” as células cancerígenas e os vírus.

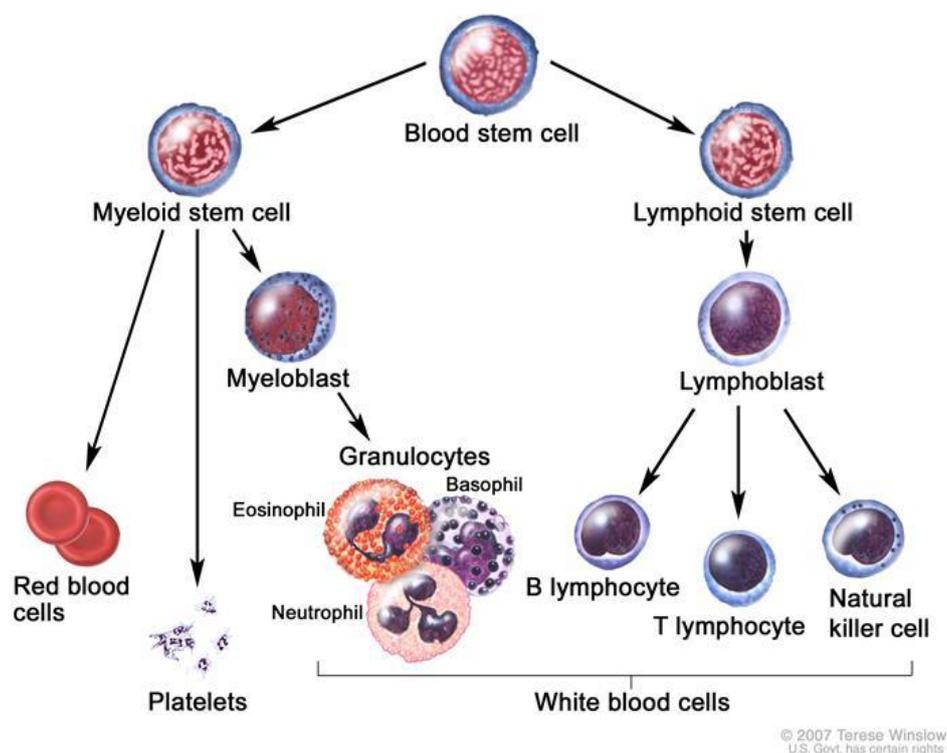


Figura 1 - Esquema geral do processo de maturação e diferenciação da célula estaminal pluripotencial (medula óssea) e formação das diferentes células do sangue.⁴

3. Leucemia: definição geral

A leucemia caracteriza-se por uma expansão clonal na etapa da hematopoiese, atingindo precursores da série linfóide ou mielóide, ocorrendo uma diferenciação celular com proliferação e crescimento descontrolado das células hematopoiéticas e, também, uma substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas.^{1,2}

As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células com transformações malignas. As leucemias agudas caracterizam-se pela sua evolução, relativamente rápida e pela proliferação de células muito indiferenciadas. Pelo contrário, as leucemias crônicas caracterizam-se pelo seu lento crescimento, rápida evolução e células muito pouca indiferenciadas.^{2,3}

Considerando as leucemias definidas como agudas ou crônicas, estas podem ser, ainda, classificadas consoante a sua origem. Desta forma, dividem-se em linfóides e mielóides.²

Esta monografia vai abordar, mais especificamente, a biologia e terapêutica da leucemia mielóide crónica (LMC).

4. Leucemia Mielóide Crónica (LMC) e cromossoma *Philadelphia*

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma neoplasia resultante da expansão clonal da linha granulocítica, com origem na célula estaminal hematopoiética pluripotente. Caracteriza-se pela ocorrência de uma superprodução de células da série mielóide, resultantes de uma proliferação excessiva e apoptose reduzida.⁵

A LMC progride de uma fase inicial crónica (FC), caracterizada por hiperplasia da medula óssea e aumento do número de células mielóides diferenciadas, para fases avançadas da doença (fase acelerada (FA) e crise blástica (CB)), as quais são caracterizadas por um bloqueio na diferenciação, uma acumulação de blastos e de células hematopoiéticas normais, especialmente linfócitos.⁶

A LMC foi a primeira doença maligna descrita, associada a uma anomalia citogenética específica, o cromossoma *Philadelphia* (Ph), resultante da formação do oncogene *BCR-ABL*⁶, e que está presente nas células da medula óssea em mais de 90% dos casos.⁸

4.1. SINAIS E SINTOMAS

Muitos doentes com leucemias crônicas são assintomáticos e a doença só é identificada quando se deteta uma anormalidade nos testes laboratoriais de rotina. Estes doentes podem desenvolver sintomas constitucionais, como a fadiga, anorexia, perda ponderal, sudorese aumentada e febre. Com o envolvimento progressivo da medula óssea e o desenvolvimento de citopenias, várias infecções podem ocorrer, assim como hemorragias, sintomas associados a anemia (por exemplo: dispneia, tonturas e fadiga), e nódos negros com petéquias. Os doentes podem, também, apresentar hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, que resultam numa sensação de plenitude abdominal, juntamente com desconforto e saciedade precoce, bem como hiperleucocitose, que pode ter como consequência uma esplenomegalia significativa.

O envolvimento cardíaco é o fator mais comum, com possibilidade de necrose, fibrose endomiocárdica, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência valvular e trombose venosa mural. Para além disto, pode, também, afetar a nível neurológico (disfunção cognitiva, neuropatia periférica); pulmonar (tosse); cutâneo (angioedema, pápulas, nódulos, urticária); gastrointestinal; intra-ocular; reumatológico e renal.⁹

4.2. CROMOSSOMA PHILADELPHIA(PH): PATOGÉNESE MOLECULAR

A anomalia cromossômica *Ph* encontra-se presente em mais de 90% dos doentes com LMC. É caracterizada por uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$ (Figura 2) e encontra-se presente nas células hematopoiéticas e ausente nas outras células do organismo humano.

Esta anomalia ocorre na célula estaminal pluripotente, e insere-se, maioritariamente, em eritrócitos, mielócitos, monócitos e megacariócitos, e, menos frequentemente, em linfócitos B e linfócitos T(raramente). O ponto de quebra do cromossoma 9 origina uma translocação do oncogene *ABL1* para uma região específica do cromossoma 22, o gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*).

O gene *ABL1* é um homólogo do oncogene *V-ABL* do vírus Abelson que causa leucemia em murganhos. A translocação na LMC em humanos, resulta numa justaposição do segmento 5' *BCR* em 22q11 e do segmento 3' do oncogene *ABL* (*ABL1*)



Figura 2- Translocação cromossômica *Ph*
 $t(9;22)(q34;q11)^s$

em 9q34, originando uma nova oncoproteína, *BCR-ABL* com peso molecular de 210kDa(p210*BCR-ABL*). Esta proteína quimérica tem uma atividade cinase não controlada, causando, assim, uma proliferação excessiva e uma apoptose reduzida das células da LMC. As células estaminais normais, embora estejam suprimidas, persistem e reincidem, mesmo após uma terapêutica eficaz. (Figura 3).

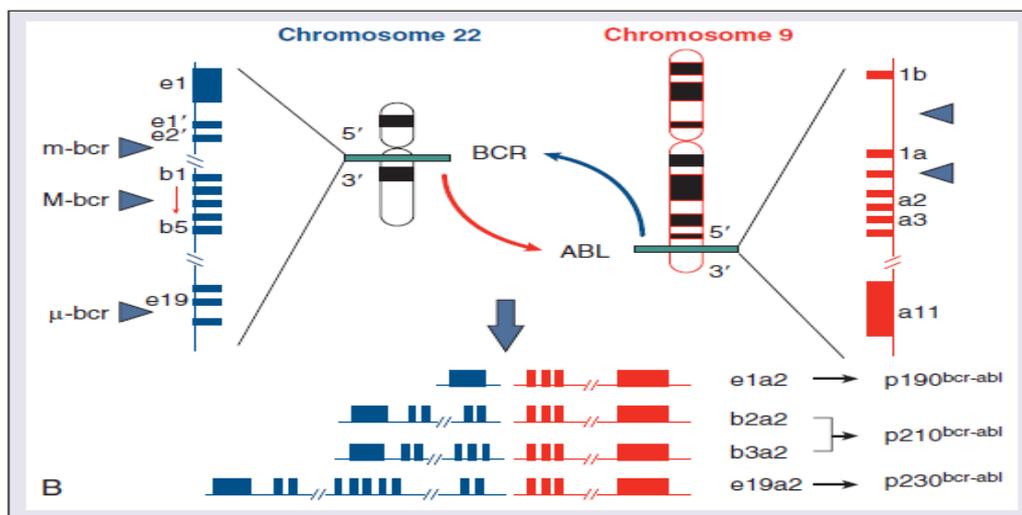


Figura 3- Formação do oncogene quimérico *BCR-ABL* pela translocação t(9q;22q). Ilustração dos pontos de quebra dentro do gene *BCR* e do gene *ABL* e dos transcritos de fusão resultantes da translocação que dão origem aos diferentes fenótipos de LMC. Esquematização dos domínios das proteínas *bcr* e *abl*.⁵

A ativação constitutiva da oncoproteína *BCR-ABL* resulta do processo de auto-fosforilação e ativação das vias, a jusante, que regulam a transcrição de genes, a apoptose, a organização do citoesqueleto, a citoadesão e degradação de proteínas inibidoras. Estas vias de transdução de sinal incluem membros das principais vias de sinalização como *RAS* (*Rat Sarcoma*), proteína cinase ativada por mitogénos (*MAPK*), transdutores de sinal e ativadores da transcrição (*STAT*) e a *Phosphatidilinositol-3 cinase* (*PI3K*), entre outros. Muitas destas interações são mediadas pela via de sinalização dos recetores da tirosina cinase e requerem a ligação do gene *BCR-ABL* a moléculas adaptadoras de proteínas, tais como a *GRB-2*, *CRK-like protein* (*CRKL*), e proteínas com domínios de homologia *src* (*SHC*).

De modo a compreender melhor a fisiopatologia da LMC, desenvolveram-se terapêuticas específicas, que serão abordadas, posteriormente, no ponto 5 desta monografia.

O gene de fusão *BCR-ABL* e a oncoproteína de P210 estão presentes na LMC morfológica típica, em alguns doentes, no entanto, a $t(9; 22) (q34; q11)$ pode não ser identificada. Nestes doentes ocorre uma resposta à terapêutica, assim como uma taxa de sobrevivência semelhante à que acontece nos casos de *Ph+*. Relativamente aos doentes que apresentam *Ph-* e LMC com o gene *BCR-ABL*-negativo, o prognóstico é pior, e a LMC é designada de atípica.⁵

4.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LMC pode ser feito numa das três fases características desta patologia hematológica: fase crónica estável; fase acelerada e crise blástica.

A fase acelerada, definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), apresenta uma alteração num dos seguintes parâmetros: 10% a 19% de mieloblastos na circulação periférica ou na medula óssea; basófilos no sangue periférico superior a 20%; plaquetas inferior a 100 000/ μ L não relacionada com a terapêutica; esplenomegalia progressiva e contagem de leucócitos pouco responsivos à terapêutica; evidência da evolução citogenética.

A crise blástica assemelha-se a uma leucemia aguda, a qual pode apresentar mais de 20% de blastos na medula óssea ou na circulação periférica; presença de grandes agregados e aglomerados de blastos na biópsia da medula óssea, ou o desenvolvimento de infiltrados blásticos extramedulares, que afetam, mais frequentemente, a pele, nódulos linfáticos, baço, osso, ou o sistema nervoso central. As principais características das fases acelerada e blástica estão indicadas na Tabela I.⁶

Tabela I: Definições das fases acelerada e blástica na Leucemia Mielóide Crónica.⁶

Criteria	MD Anderson Cancer Center*	International Bone Marrow Transplant Registry	World Health Organization
ACCELERATED PHASE			
Percent blasts	15-29	10-29	10-19
Percent blasts + promyelocytes	≥ 30	≥ 20	NA
Percent basophils	≥ 20	$\geq 20\%$ (basophils + eosinophils)	≥ 20
Platelets ($\times 10^9/L$)	< 100	Unresponsive \uparrow , persistent \downarrow	< 100 or > 1000 unresponsive
Cytogenetics	CE	CE	CE not at diagnosis
WBC	NA	Difficult to control, or doubling in < 5 days	NA
Anemia	NA	Unresponsive	NA
Splenomegaly	NA	Increasing	NA
Other		Chloromas, myelofibrosis	Megakaryocyte proliferation, fibrosis
BLASTIC PHASE			
30% or more blasts; or extramedullary blastic disease, except for the World Health Organization classification, which requires 20% or more.			

*These criteria were also used in all the IFN- α and tyrosine kinase inhibitors studies. CE, clonal evolution; NA, not applicable; WBC, white blood cells.

4.3.1. ENSAIOS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO E CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA À TERAPÊUTICA

- Citogenética convencional e citogenética molecular (FISH) na detecção da $t(9; 22)(q34;q11)$:

Estes testes de diagnóstico, para doentes com LMC, permitem detetar, especificamente, a anormalidade do cromossoma *Philadelphia* e do gene de fusão *BCR-ABL*, e baseiam-se em testes “standard” de citogenética, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), e reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa(RT-PCR).

A citogenética convencional constitui um dos ensaios mais importantes na detecção do cromossoma *Ph* e na monitorização da resposta. As desvantagens deste tipo de ensaios passam pela baixa sensibilidade, que é limitada a um intervalo de células *Ph+* de 1-5% da amostra; atraso no tempo devido à necessidade de se obterem células em crescimento, assim como, a necessidade de aspiração da medula óssea e na indução da divisão celular para a análise das células em metafases. A citogenética convencional é, também, importante para a detecção de anormalidades cromossómicas, especialmente, no caso de evolução clonal *Ph+/-* (durante a terapêutica), que pode, embora raramente, progredir para uma síndrome mielodisplásica.

Relativamente ao cariótipo *Ph*-negativo na LMC, os rearranjos *BCR-ABL* podem ser encontrados tanto em casos com um cariótipo normal, como em casos com cariótipo complexo em que a $t(9; 22)$ não é detetada por análises citogenéticas convencionais. A localização, mais comum, do gene de fusão *BCR-ABL* no cariótipo é na primeira banda, da região 1, do braço longo do cromossoma 22, 22q11, e, em menos casos, está localizado na quarta banda, da região 1 do braço longo do cromossoma 9, 9q34.

Assim, foram propostos dois mecanismos principais para explicar a formação do gene de fusão *BCR-ABL*. O primeiro, e mais simples, baseia-se no fato de existir uma inserção de material cromossómico, não-recíproca, entre os cromossomas 9 e 22, podendo, esta, ocorrer dentro de qualquer cromossoma.

A explicação mais complexa envolve duas translocações sequenciais. Em primeiro lugar, existe uma translocação inicial padrão, (9; 22) (q34; q11), que é seguida por uma translocação inversa com diferentes pontos de quebra, constituindo, assim, o

par cromossômico. O gene de fusão pode ser situado no locus 22q11 ou no locus recíproco em 9q34, dependendo dos locais de quebra cromossômica.

Nos estudos publicados por *Bennour et al.* (ref.10), em três doentes com LMC, usando as técnicas *FISH* e *RT-PCR*, o gene de fusão foi encontrado no cromossoma 22 em dois casos e o caso restante, no cromossoma 9.¹⁰

Em conclusão, o prognóstico é igual, tanto em doentes *Ph+* como em doentes *Ph-*, da mesma forma que o tratamento aplicado aos dois grupos.

- A citogenética molecular baseia-se na marcação de cromossomas, ou segmentos cromossômicos, por hibridização *in situ*, utilizada quando não é possível realizar a análise cromossômica. A técnica de marcação por *FISH* é a que se aplica mais frequentemente e define-se como um ensaio específico, muito utilizado em doenças hematológicas. Comparativamente à citogenética convencional, identifica, rapidamente, as anomalias genéticas específicas e necessárias para um diagnóstico mais preciso. Desta forma, permite a deteção do gene *BCR-ABL*, especialmente quando o teste de citogenética é negativo ou quando não se obtêm células em metafase. No entanto, a citogenética apresenta-se, ainda, com mais capacidades para monitorizar a evolução clonal da doença na fase avançada da mesma.¹⁰

Atualmente, combinam-se as duas técnicas na monitorização quantitativa e, particularmente, quando a *PCR* não está disponível. A citogenética molecular é, também, importante na identificação de deleções nos pontos de quebra do *BCR-ABL*, pois há estudos que referem que estas deleções podem afectar a duração da resposta dos *TKIs*, mais especificamente, as deleções no cromossoma 9.¹⁰

- *RT-PCR MULTIPLEX*

A maioria dos métodos atuais de *RT-PCR* para a deteção do *BCR-ABL*, foram concebidos e otimizados de modo a detetar os transcritos *M-BCR* e *m-BCR*.

Em relação à deteção de mRNA do *BCR-ABL*, é usada uma sonda e um par de *primers* para amplificar os dois transcritos de genes de fusão (e13a2 e e14a2).

Apesar da técnica de *FISH* ser mais rápida e fácil no *screening* de 100 a 1000 células, na presença do cromossoma *Philadelphia*, comparativamente com o método *RT-PCR multiplex*, este último consegue, também, detetar quase todos os tipos de

transcritos *BCR-ABL* na fase de diagnóstico, assim como estabelecer o perfil das suas configurações moleculares.

Esta metodologia permite, também, detetar o *Ph-* na LMC, mas com o transcrito *BCR-ABL*, que se torna importante reconhecer pelo fato de partilhar o mesmo prognóstico dos casos *Ph+*.

O fato de usar sangue periférico e, desta forma, evitar repetidas aspirações da medula óssea, confere-lhe uma grande vantagem para os doentes.

No que diz respeito ao tempo, a análise molecular através deste método, é muito mais sensível e rápida em comparação com as técnicas de citogenética e *PCR* convencionais.¹⁰

5. TERAPÊUTICA

Existem três tipos de respostas, avaliadas na LMC, que são essenciais na eficácia do seu tratamento (Tabela 2):^{11,12}

- Resposta Hematológica Completa (RHC)- é avaliada através da contagem de leucócitos no sangue, o seu diferencial e contagem de plaquetas;
- Resposta Citogenética Completa (RCC)- é avaliada através da percentagem de células em metafase *Ph+* na amostra de medula óssea.
- Resposta Molecular Completa (RMC)- utilizada para detetar a presença ou ausência de transcritos *BCR-ABL* através de *RT-PCR*;

Tabela 2: Tipo de resposta e monitorização da LMC.^{11,12}

	Resposta hematológica (RH)	Resposta citogenética (RC)	Resposta Molecular (RM)
Definição	Completa (RHC): Plaquetas <450 x 10 ⁹ /L; Contagem de leucócitos: <10x10 ⁹ /L; Diferencial sem granulócitos imaturos e <5% basófilos; Baço não palpável	Completa (RCC): Ph+0% Parcial : Ph+ 1%-35% Minor: Ph+36%-65% Minimal: Ph+66%95% None: Ph+>95% Major: PCyR + CCyR	Completa (RMC): 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

5.1. EVOLUÇÃO DA TERAPÊUTICA

O busulfan, a hidroxiureia, o interferão alfa com ou sem citarabina e o transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas, constituíam, até há pouco tempo, a única terapêutica disponível para a LMC. Embora, na maioria dos casos, se verificasse melhoria dos sintomas, remissão hematológica e redução da esplenomegalia, eram raros os casos em que era alcançada a resposta citogenética completa.¹³

5.2. INIBIDORES DE TIROSINA CINASE (TKIS)

A proteína *BCR-ABL*, pela elevada atividade de tirosina cinase que possui, constitui o grande alvo no tratamento da LMC.

As proteínas com ação tirosina cinase, atuam através da fosforilação da *BCR-ABL* (desencadeando cascatas das vias de sinalização), regulando, desta forma, a proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares.^{13,15}

A descoberta dos inibidores de tirosina cinase (TKIs), aproximadamente há 15 anos, revolucionou as estratégias para o tratamento da LMC *Ph*⁺. O seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio da via do *BCR-ABL*, e a diferença existente entre eles é, relativamente, à afinidade relativa que apresentam com o gene de fusão e outras cinases alvo.^{13,15}

O imatinib foi o primeiro inibidor desta classe desenvolvido e aprovado, em 2001, pela *FDA (Food and Drug Administration)* para o tratamento de primeira linha da LMC na fase crónica, blástica e acelerada. Este composto liga-se, competitivamente, ao local de ligação do ATP, inibindo a fosforilação e ativação da via tirosina cinase da *ABL* e, desta forma, previne a transformação desta proteína na sua forma ativa(Figura 4).^{13,14}

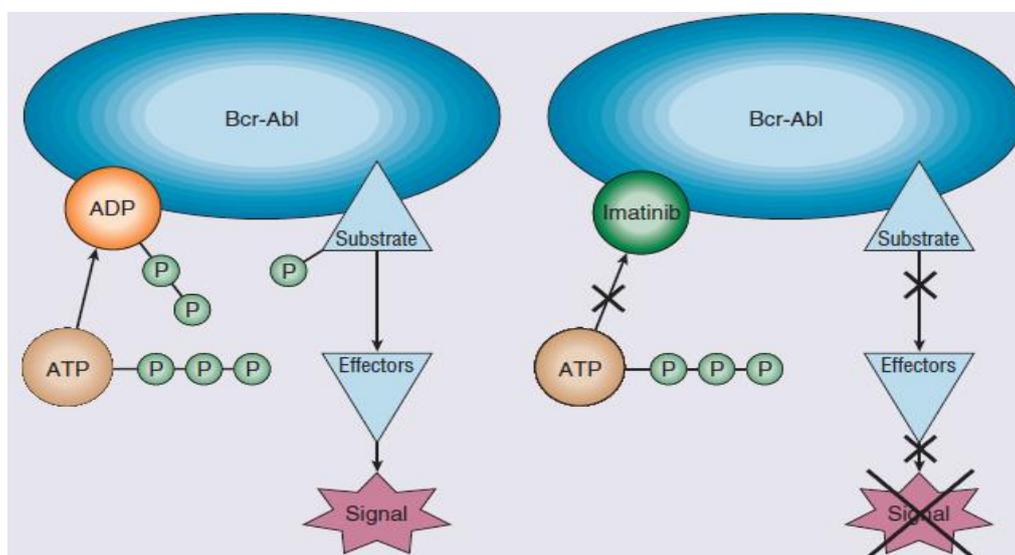


Figura 4: Esquema do mecanismo de ação do inibidor de tirosina cinase, Imatinib.⁵

Uma resposta específica, possível de ser alcançada dentro de um prazo de tempo definido, constitui o princípio, no qual se baseiam as recomendações de tratamento, da neoplasia em questão, estipuladas pela *European Leukemia Net (ELN)*, definindo, assim uma resposta ótima, sub-ótima e falência durante o tratamento com imatinib(Tabela 2).

De acordo com estas recomendações, uma resposta ótima inclui o alcance da RC em 12 meses e da RM em 18 meses. Alguns estudos independentes confirmaram que os doentes que apresentam falha ou resposta sub-ótima com o imatinib, são mais propensos a ter resultados, significativamente, piores do que os doentes que respondem de forma otimizada. Desta forma, sugerem que, o aumento da proporção de doentes com diagnóstico recente de LMC-FC que alcançam uma resposta ótima à

terapêutica de primeira geração, influencia a diminuição de ocorrência de progressão para a FA/CB e para outros resultados negativos.¹⁷

No estudo de *Emole et al.*, o imatinib, apesar de ter sido bem sucedido e eficaz como terapêutica no tratamento da LMC, ao apresentar 83% de *event-free survival* e 93% de ausência de progressão para a fase acelerada ou blástica em 6 anos, verificaram-se diversos casos de resistência primária. Esta resistência adquirida, pensa-se, que é consequência de vários fatores como a biodisponibilidade do fármaco; adesão ao tratamento; alterações genéticas; farmacodinâmica e mutações no domínio da proteína *BCR-ABL* (aumento da expressão e amplificação do gene).

Assim, surgiu a necessidade de optar por novos *TKIs*, como terapêutica de segunda linha, mais potentes, seguros e eficazes contra a LMC resistente ao imatinib.^{13,14}

5.2.1. INIBIDORES DE TIROSINA CINASE DE SEGUNDA GERAÇÃO E TERCEIRA GERAÇÃO

Para além do imatinib, existem, neste momento, quatro *TKIs*, aprovados pela *FDA*, que constituem opções terapêuticas no tratamento da neoplasia da LMC:

- | | | |
|--------------------------------|---|------------------|
| 1) Nilotinib- aprovado em 2007 | → | SEGUNDA GERAÇÃO |
| 2) Dasatinib- aprovado em 2006 | | |
| 3) Bosutinib- aprovado em 2012 | → | TERCEIRA GERAÇÃO |
| 4) Ponatinib- aprovado em 2012 | | |

- O **Nilotinib** (*Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, EUA*) é um inibidor fenil-amino-pirimidina da *BCR-ABL*, de segunda geração. Apresentando semelhança com o imatinib, este composto liga-se à proteína *abl* na conformação inativa, embora com um ajuste mais apertado para a mesma.

Este fármaco é cerca de 10 a 50 vezes mais potente que o imatinib e 10 a 20 vezes mais ativo do que o mesmo, relativamente à redução da auto-fosforilação da *BCR-ABL* e da proliferação celular. Para além disto, alguns ensaios de proliferação *in vitro* provaram que o nilotinib apresenta atividade em 32 de 33 mutantes resistentes ao imatinib, e ausência de atividade contra a mutação T315I. Apresenta, ainda, atividade contra outras cinases, tais como c-kit e o recetor *PDGFRα/β*, e, ao contrário dos

outros inibidores de segunda geração da tirosina cinase (dasatinib e bosutinib), o nilotinib tem efeitos mínimos sobre cinases da família *src*.

Segundo o estudo de *Emole et al.*(ref.13) a dose recomendada deste fármaco é de 400 mg duas vezes/dia (2i.d) (segunda linha) ou 300 mg duas vezes/dia (primeira linha) por via oral. É metabolizado no fígado, principalmente pelas enzimas microsossomais da CYP3A4 (oxidação e hidroxilação), embora a UDP-glucuronil transferase possa desempenhar um papel, relativamente, secundário no seu metabolismo.¹³

- O **Dasatinib** (*Bristol-Myers Squibb, Princeton,USA - Sprycel®*) é outro inibidor potente, que inibe a atividade das cinases oncogénicas *BCR-ABL*, *Src*, *c-kit*, e o recetor PDGF-R. Este inibidor define-se como sendo duplo, pois tanto se liga à conformação ativa, como à conformação inactiva da *bcr-abl*, e, para além disso, verificou-se em modelos pré-clínicos de *Kantarjian et al.*(ref. 5), que é 300 vezes mais potente do que o imatinib e eficaz contra todas as mutações no domínio cinase resistentes ao imatinib, excepto a T315I.

No estudo clínico piloto de *Kantarjian et al.* de fase II, mais conhecido como START, demonstrou uma elevada eficácia do dasatinib em todas as fases da LMC, após falência do tratamento com imatinib. Em 387 doentes com LMC em fase crónica, após falha do imatinib, o dasatinib 70 mg por via oral (duas vezes/dia) produziu uma taxa de RH de 90%, uma taxa de resposta citogenética major de 52%, uma taxa de resposta citogenética completa de 39%. As taxas de resposta foram superiores em doentes com intolerância ao imatinib vs resistência, mas foram semelhantes em termos de presença ou ausência de mutações.

Noutro estudo randomizado de *Kantarjian et al.* com diferentes doses de dasatinib (50 mg duas vezes por dia, 100 mg de dose única diária, 70 mg duas vezes por dia, 140 mg de dose única diária) em 670 doentes com LMC em fase crónica, após falha com imatinib, mostrou que com uma dose única diária de dasatinib 100 mg, os efeitos adversos foram inferiores, sendo, esta, a dose padrão para a doença em fase crónica.⁵

- O **Bosutinib** (*Bosulif®; Pfizer, NY, USA*), é um composto que impede especificamente a atividade das cinases *BCR-ABL*, *Src* e apresenta, também, uma

atividade adicional contra várias tirosinas e serina-treonina cinases associadas à propagação das células da leucemia mielóide.

Este fármaco, embora não tenha atividade contra as mutações T315I e V299L, é mais potente do que o imatinib e é ativo contra a maioria das mutações resistentes ao mesmo, tornando-se, desta forma, uma alternativa com muito potencial terapêutico.

Ao contrário de outros inibidores de segunda geração, este o bosutinib inibe, minimamente, a c-Kit e o recetor do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), que têm um papel importante na hematopoiese. Esta característica permite explicar o seu largo índice terapêutico e o baixo potencial de mielossupressão, comparativamente com os outros TKIs.

Num estudo randomizado de *Doan et al.* (ref. 14), com dupla ocultação e controlado por placebo, feito em indivíduos saudáveis, verificou-se que as doses de bosutinib de 200-600 mg foram consideradas seguras e bem toleradas quando tomadas com alimentos, com um tempo de semi-vida, relativamente, longo, demonstrando, também eficácia em doentes com LMC em fase crónica, blástica e acelerada com resistência ou intolerância ao tratamento com imatinib ou a outros TKIs prioritários.

No estudo *open-label* de *Doan et al.* de fase I/II, foi avaliada a terapêutica com bosutinib em doentes com LMC em fase crónica, que já tinham apresentado resistência ou intolerância ao imatinib. Os resultados da Fase I determinaram a dose utilizada na parte do estudo da fase II, avaliando, assim, a segurança e a eficácia de bosutinib em doentes resistentes (n = 200) ou intolerantes (n = 88) ao imatinib. Na avaliação da fase II, os doentes receberam bosutinib 500 mg/dia, com aumento de dose para 600 mg/dia, isto se esta terapêutica não induzisse uma RHM em 8 semanas ou uma RCC em 12 semanas, verificando-se, então uma percentagem de 33% de doentes resistentes ao imatinib e 27% de intolerância ao mesmo. Desta forma, pelos resultados apresentados através dos vários tipos de respostas avaliados, concluiu-se que o bosutinib é eficaz e seguro em doentes com LMC-FC com resistência ou intolerância ao imatinib, e, ainda que tem uma eficácia bastante duradoura e níveis de toxicidade adequados.

Em conclusão, este fármaco para além de apresentar taxas de resposta comparáveis com as taxas dos outros TKIs de segunda geração em doentes com resistência ou intolerância ao imatinib, mostrou, também, induzir RC em doentes que apresentavam resistência ou intolerância ao nilotinib e ao dasatinib.(Figura 4)^{14,18}

Response to Second-Generation TKIs in Patients With Chronic-Phase CML Resistant or Intolerant to Imatinib ^{a,b}			
Medication	Rate of Patient Response (%) at 6 mo		
	CHR	MCyR	CCyR
Dasatinib ¹⁰	90	45	33
Nilotinib ¹²	74	48	31
Bosutinib ²²	86	31	23

^aTKI = tyrosine kinase inhibitor, CML = chronic myeloid leukemia, CHR = complete hematologic response, MCyR = major cytogenetic response, CCyR = complete cytogenetic response.
^bData are derived from single-arm noncomparative studies.

Figura 4- Respostas dos TKIs de segunda geração em doentes com LMC-FC, que apresentaram resistência ou intolerância ao imatinib.¹⁴

- O **Ponatinib** é um inibidor multi-cinase de terceira geração que demonstrou, *in vitro*, ser mais potente do que qualquer outro inibidor da tirosina-cinase contra a *BCR-ABL* e alguns mutantes. No estudo de *Fava et al*(ref. 19), este fármaco mostrou, também, ser extremamente eficaz no tratamento de doentes com LMC, resistentes ou intolerantes a outros inibidores. Desta forma, este composto foi aprovado como terapêutica em doentes com LMC-*Ph+*, incluindo doentes que apresentam a mutação *BCR-ABL* T315I.

A eficácia do ponatinib vs imatinib foi testada em doentes recém-diagnosticados com leucemia mielóide crônica, no estudo de *Fava et al*, em que se investigou se este fármaco poderia contornar a resistência relacionada com a mutação, no seu tratamento, verificando-se, assim, uma eficácia superior em doentes com um diagnóstico recente de LMC e, também, que todas as respostas foram obtidas mais rapidamente com o ponatinib do que com o imatinib. Neste estudo, com 51 doentes tratados com uma dose média de 30 mg, a maioria da população tratada (94%) atingiu uma RM precoce e nenhum doente progrediu na doença.

Embora tenha demonstrado eficácia em vários ensaios clínicos, este fármaco mostrou, ainda, efeitos adversos de risco, e, por este motivo, o seu potencial deve ser avaliado em doses mais baixas, mesmo no ajuste como terapêutica de primeira linha, com critérios de inclusão mais rigorosos para evitar que os doentes apresentem altos scores de risco cardiovascular.¹⁹

6. EFEITOS ADVERSOS DOS INIBIDORES DE TIROSINA CINASE

Todos os inibidores de tirosina-cinase, apesar da eficácia, segurança e tolerância demonstradas, apresentam diversos efeitos adversos, que podem pôr em causa a sua correta adesão.¹⁸

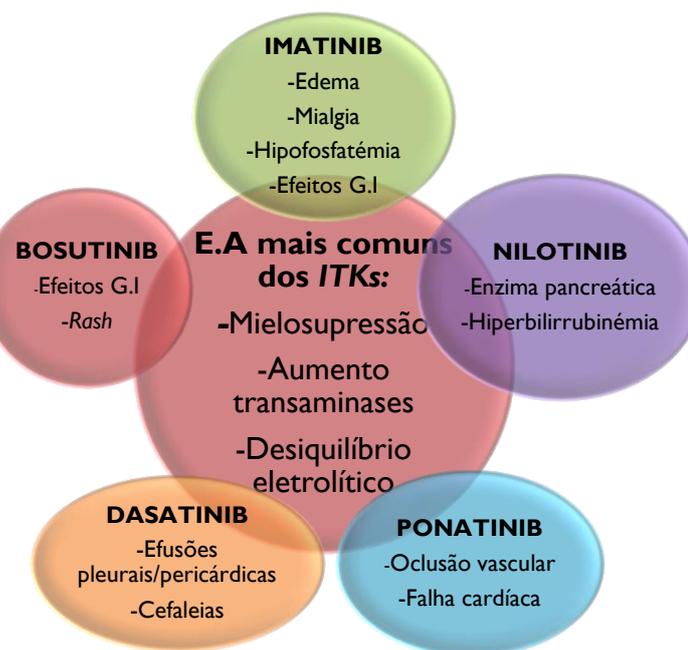


Figura 5- Efeitos adversos mais comuns dos TKIs na LMC.¹⁸

7. CONCLUSÕES

A LMC, apesar de constituir um caso de sucesso em termos de tratamento oncológico moderno, em que a redução precoce e drástica da contagem de células *Ph+* constituiu a base de partida das medidas terapêuticas implementadas para evitar a progressão da doença, existe ainda uma série de desafios a alcançar.

É notório o papel que a oncoproteína *bcr-abl* exerce no desenvolvimento desta neoplasia, sendo, esta, o alvo fulcral das estratégias terapêuticas. No entanto, as mutações que têm ocorrido neste domínio, têm influenciado muito a resposta ao tratamento com TKIs. Pode, assim, concluir-se que existe, ainda, uma falha na compreensão de todos os mecanismos fisiopatológicos resultantes da mutação $t(9;22)(q34;11)$, assim como, na compreensão dos mecanismos inerentes aos efeitos adversos dos TKIs.

A terapia-alvo com TKIs tem melhorado, significativamente, o prognóstico da LMC, especialmente, em doentes em fase crónica. Porém, o surgimento de resistência a estes inibidores, numa minoria de doentes recentemente diagnosticados, parece estar associado às complexas interações na fisiopatologia da doença e à necessidade de melhorar, continuamente, a terapêutica.

Futuramente, a terapêutica de primeira linha juntamente com a nova geração de inibidores da tirosina cinase poderá reduzir ou evitar casos de resistência, devido a mutações ou outros mecanismos e aumentar o desaparecimento de transcritos *bcr-abl* ABL (devido a uma possível interrupção do tratamento). A terapêutica envolvendo combinações de *TKIs* com outros fármacos prometem atingir a prática clínica e ter sucesso.

O desenvolvimento de vacinas e a identificação de novos alvos terapêuticos são, também novas estratégias que se encontram em fase de desenvolvimento e pretendem atingir as células leucémicas

8. BIBLIOGRAFIA

1. FARIAS, M. G., & Castro, S. M. De. (2004). Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, 40(2), 91–98. <http://doi.org/10.1590/S1676-24442004000200008>
2. JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José - Histologia Basica I | Edicao - Junqueira e Carneiro.pdf. 2008) 535.
3. PEREIRA, Ana Marques - Leucemia Mielóide Crónica - Manual para Doentes e Familiares. ISBN 9789729962172.
4. PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD - Chronic Myelogenous Leukemia Treatment (PDQ®): Patient Version [Em linha] [Consult. 9 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389183>>.
5. KANTARJIAN, Hagop; CORTES, Jorge - Chronic Myeloid Leukemia [Em linha]. Fifth Edition ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2014 Disponível em WWW:<URL:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-2865-7.00101-6>>.
6. BHATIA, Ravi - Chronic myeloid leukemia. Hematology: Basic Principles and Practice , Sixth Edition. Cml (2013) Chapter 66, 981–997. doi: 10.1016/B978-1-4377-2928-3.00066-6.
7. MAURO, M. J.; DRUKER, B. J. - Chronic myelogenous leukemia. [Em linha]. Second Edition ed. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2001 Disponível em WWW:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646934>>. ISBN 1040-8746.
8. KANTARJIAN, Hagop; O'BRIEN, Susan - The Chronic Leukemias [Em linha]. Twenty Fifth Edition ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2011 Disponível em WWW:<URL:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-5017-7.00184-7>>. ISBN 9781437716047.
9. MAURO, M. J.; DRUKER, B. J. - Chronic myelogenous leukemia. [Em linha]. Second Edition ed. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2001 Disponível em WWW:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646934>>. ISBN 1040-8746.
10. BENNOUR, Ayda; SAAD, Ali; SENNANA, Halima - Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. . ISSN 18790461. 97:2016) 263–274. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.020.

11. KANTARJIAN H, SCHIFFER C, JONES D, CORTES J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leucemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008; 111:1774
12. BACCARANI M, CORTES J, PANE F, et al. Chronic myeloid leucemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. *J Clin Oncol* 2009; 27:6041. ~
13. EMOLE, Josephine; TALABI, Taiwo; PINILLA-IBARZ, Javier - Update on the management of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: Role of nilotinib. *Biologics: Targets and Therapy*. . ISSN 11775491. 10:2016) 23–31. doi: 10.2147/BTT.S67844.
14. DOAN, Vi; WANG, Alice; PRESCOTT, Hillary - Bosutinib for the treatment of chronic myeloid leukemia. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. . ISSN 15352900. 72:6 (2015) 439–447. doi: 10.2146/ajhp140221.
15. GOLDMAN, John M. - Chronic myeloid leukaemia. *Medicine*. . ISSN 13573039. 37:4 (2009) 195–197. doi: 10.1016/j.mpmed.2008.12.005.
16. THOMPSON, Philip A.; KANTARJIAN, Hagop M.; CORTES, Jorge E. - Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clinic Proceedings*. . ISSN 19425546. 90:10 (2015) 1440–1454. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.08.010.
17. ROSTI, Gianantonio et al. - Second-generation BCR-ABL inhibitors for frontline treatment of chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. . ISSN 10408428. 82:2 (2012) 159–170. doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.04.002.
18. BETHELMIE-BRYAN, Beverly et al. - Bosutinib treatment for Philadelphia chromosome-positive leukemias. 10:2014) 179–185.
19. FAVA, Carmen; SAGLIO, Giuseppe - Ponatinib for chronic myeloid leukaemia: Future perspectives. *The Lancet Oncology*. . ISSN 14745488. 17:5 (2016) 546–547. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30064-X.