

FARMACIA

Leucemia mielóide crônica: estratégias terapêuticas atuais e mecanismos de Resistência

Chronic myelogenous leukemia: up-to-dating therapeutic strategies and its resistance mechanisms

Ivanise M. M. Rebecchi

Mestre em farmácia e bioquímica - Profª. das disciplina de citologia e hematologia clínicas UNIMEP, Piracicaba

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) foi o primeiro processo neoplásico associado com uma anormalidade genética adquirida, a translocação entre os cromossomos 9 e 22 resultando no cromossomo Philadelphia. A consequência dessa translocação é o surgimento de um gene híbrido, o *bcr-abl*, que é traduzido em uma proteína de fusão, a BCR-ABL. Essa oncoproteína apresenta atividade tirosina quinase aumentada e é responsável pelo processo oncogênico caracterizado por inibição da apoptose celular, modificações na matriz extracelular e alterações na sinalização celular.

O regime quimioterápico para o tratamento dessa doença apresenta caráter paliativo, sendo que, muitos pacientes

não respondem adequadamente ou após algum tempo do tratamento passam a apresentar uma resposta pouco satisfatória. A falha na resposta tem sido associada a mecanismos de resistência celular, dentre esses mecanismos a expressão do fenótipo de resistência a múltiplos fármacos. A expressão dos genes *MDR1* (*multidrug resistance gene 1*), *MRP1* (*multidrug resistance associated porotein 1*) e *LRP* (*lung resistance protein/major vault protein*) já foi descrita e associada com a falha na resposta aos quimioterápicos.

Palavras-chave: leucemia, mecanismos de resistência, *bcr-abl*, STI-571, hidroxiuréia, bussulfan, interferon alfa

ABSTRACT

Chronic Myelogenous Leukemia (CML) was the first neoplastic process linked to a consistent acquired genetic abnormality. The event in CML is a reciprocal chromosomal translocation in a hematopoietic stem cell between chromosomes 9 and 22 resulting in the Philadelphia (Ph) chromosome. The consequence of this translocation is the generation of a hybrid gene, *bcr-abl*, that is translated into a fusion protein, BCR-ABL.

The BCR-ABL fusion protein is a constitutively activated tyrosine kinase with increased activity as compared to the related c-ABL tyrosine kinase.

The increase of the tyrosine kinase activity is required for the transforming ability of the BCR-ABL oncoprotein. The transforming ability has been associated with inhibition of apoptosis, modifications in cellular matrix and alterations in signaling network.

Even though several chemotherapy regimens can be used for CML treatment, many patients do not adequately respond to the chemotherapy. The lack of response can be related to the resistance cellular mechanisms as overexpression of target proteins, or overexpression of proteins related to the phenotype of multidrug resistance, or to the increase of metabolization of drugs for isoenzymes of cytochrome P450. The expression of genes which are associated with the multidrug resistance phenotype, like *MDR-1* (*multidrug resistance gene 1*), *LRP* (*lung resistance protein/major vault protein*) and *MRP-1* (*multidrug resistance-associated protein 1*) have already been described in the last few years.

Keywords: leukemia, resistance mechanism, *bcr-abl*, STI-571, hydroxiureia, bussulfan, alfa interferon

Introdução

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) foi o primeiro processo neoplásico associado a uma anormalidade genética adquirida. As atuais estratégias medicamentosas apresentam apenas caráter paliativo, sendo que, a única medida terapêutica curativa é o transplante de medula óssea.

Dentre as estratégias medicamentosas paliativas, os quimioterápicos têm se mostrado, em um primeiro momento, eficazes. Porém, durante o curso do tratamento, para a manutenção da mesma resposta terapêutica, tem ocorrido a necessidade da administração de doses subsequentemente maiores. O aumento da dose administrada se associa com a exacerbação dos efeitos adversos e muitas vezes com a falta de resposta ao medicamento. A falha na resposta terapêutica pode ser consequência de inúmeras variáveis, dentre elas o desenvolvimento de resistência medicamentosa.

Com os avanços moleculares sobre a fisiopatologia da LMC associados à sofisticada tecnologia bioquímica e biofísica desenvolvida nas últimas décadas, inúmeras propostas terapêuticas vêm surgindo e oferecerão para um futuro não muito distante, o desenvolvimento de terapias com alvos moleculares e efeitos terapêuticos mais eficazes.

Fisiopatologia Molecular da LMC:

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa resultante de transformação oncogênica da célula primordial multipotente, a *stem cell* hematopoiética ou célula tronco⁽¹⁾. A LMC acomete células da linhagem mielóide, eritróide, megacariocítica e linfóide B e mais raramente T, mas não afeta fibroblastos medulares⁽²⁾.

As células hematopoiéticas, na LMC, apresentam uma translocação específica entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, que transpõe o segmento 3' do gene *abl* do cromossomo 9q34 ao segmento 5' do gene *bcr* (*breakpoint cluster region*) do cromossomo 22q11, gerando um cromossomo anormal, conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph)^(3,4,5,6,7,8). A figura 1 ilustra o mecanismo de translocação na formação do cromossomo Philadelphia.

A LMC é a única doença mieloproliferativa associada com o cromossomo Philadelphia, identificada por Nowell e Hungerford em 1960^(6,9).

O cromossomo Philadelphia gerado pela translocação culmina com a formação de um gene híbrido formado pela fusão dos genes *c-abl* do cromossomo 9 e *bcr* (*breakpoint cluster region*) do cromossomo 22⁽⁸⁾.

O gene *abl* codifica a proteína ABL que apresenta atividade tirosina quinase, fosforilando seus próprios resíduos de tirosina e os de outras proteínas, modulando, assim, a transdução de sinal⁽¹⁰⁾. A proteína ABL apresenta três domínios funcionais importantes, um domínio é responsável pela fosforilação, um domínio SH2 regulatório, que aumenta a atividade quinase e promove transformação celular e um domínio SH3 com atividade inibitória, que reduz a ação fosforilativa e a capacidade de transformação celular do domínio SH2⁽¹⁰⁾. Ao domínio SH3 também foi atribuída atividade regulatória da GTPase que têm ação modulatória na ação do proto-oncogene *ras*, cuja expressão está associada com o desenvolvimento do câncer⁽¹⁰⁾. A proteína ABL apresenta outros dois domínios importantes, sendo que um deles se liga a seqüências nucleotídeo específicas de DNA, sugerindo que a proteína atue como um fator de transcrição e o outro domínio apresenta alta afinidade pela f-actina presente no citoesqueleto celular, modulando a adesão celular à matriz extra celular da medula óssea⁽¹⁰⁾.

O gene *bcr* codifica a proteína BCR, cuja estrutura e atividade funcional não estão bem estabelecidas⁽¹⁰⁾. A proteína BCR parece ser uma serina/treonina quinase e foi proposto que esta proteína é homóloga às ciclinas que tem ação modulatória no ciclo celular⁽¹⁰⁾.

O gene híbrido resultante da translocação, *bcr-abl*, é transcrito em mRNAs quiméricos^(4,11,12), que servem de molde para a síntese de proteínas anormais p190, p210 e p230, cujo tamanho varia de acordo com a localização da região de quebra dos genes envolvidos^(4,5,6,13,14). A p210 foi detectada em 95% dos casos de LMC. A p190 foi observada em 15-25% dos casos de leucemia linfóide aguda (LLA) de latência curta e muito agressiva. A p230 é a forma mais recentemente descoberta e associada à leucemia neutrofílica crônica de curso brando¹⁵. O gene *bcr-abl* codifica uma proteína híbrida, com região N-terminal da proteína BCR e região C-terminal da proteína ABL⁽¹⁰⁾. A perda da região N terminal da proteína ABL resulta em atividade tirosina quinase aumentada, aumento da sua ligação à f-actina e diminuição da sua translocação nuclear⁽¹⁰⁾.

A habilidade leucemogênica do gene híbrido *bcr-abl* é atribuída à atividade tirosina quinase aumentada da proteína de fusão BCR-ABL que foi associada à inibição da apoptose, à indução da proliferação, a alterações no citoesqueleto celular e a modificações dos processos de sinalização em células portadoras do gene híbrido^(10,16). A figura 2 ilustra a formação da proteína híbrida traduzida a partir do gene *bcr-abl*.

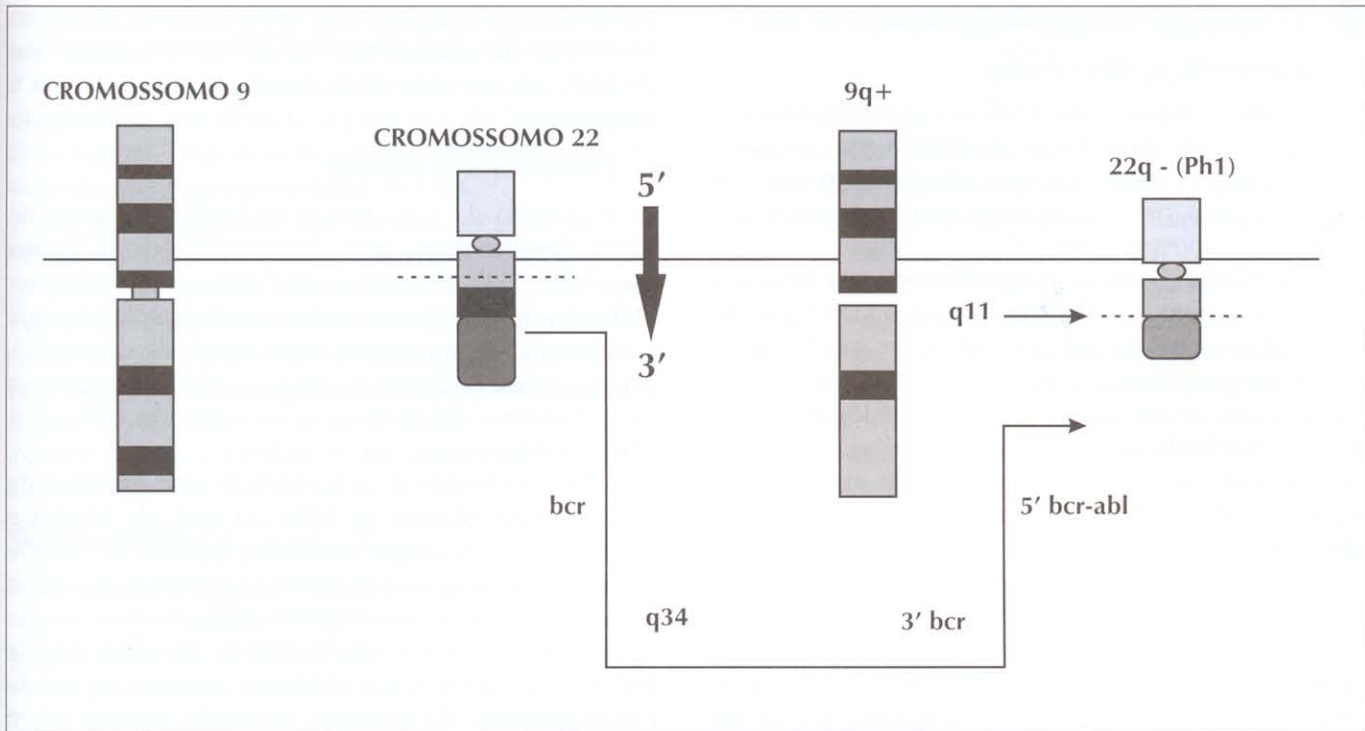


Figura 1: Translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 gerando o cromossomo Philadelphia (Ph1). A figura mostra o ponto de quebra no cromossomo 9 correspondente a localização do gene *c-abl* e o ponto de quebra no cromossomo 22 correspondente a localização do gene *bcr*

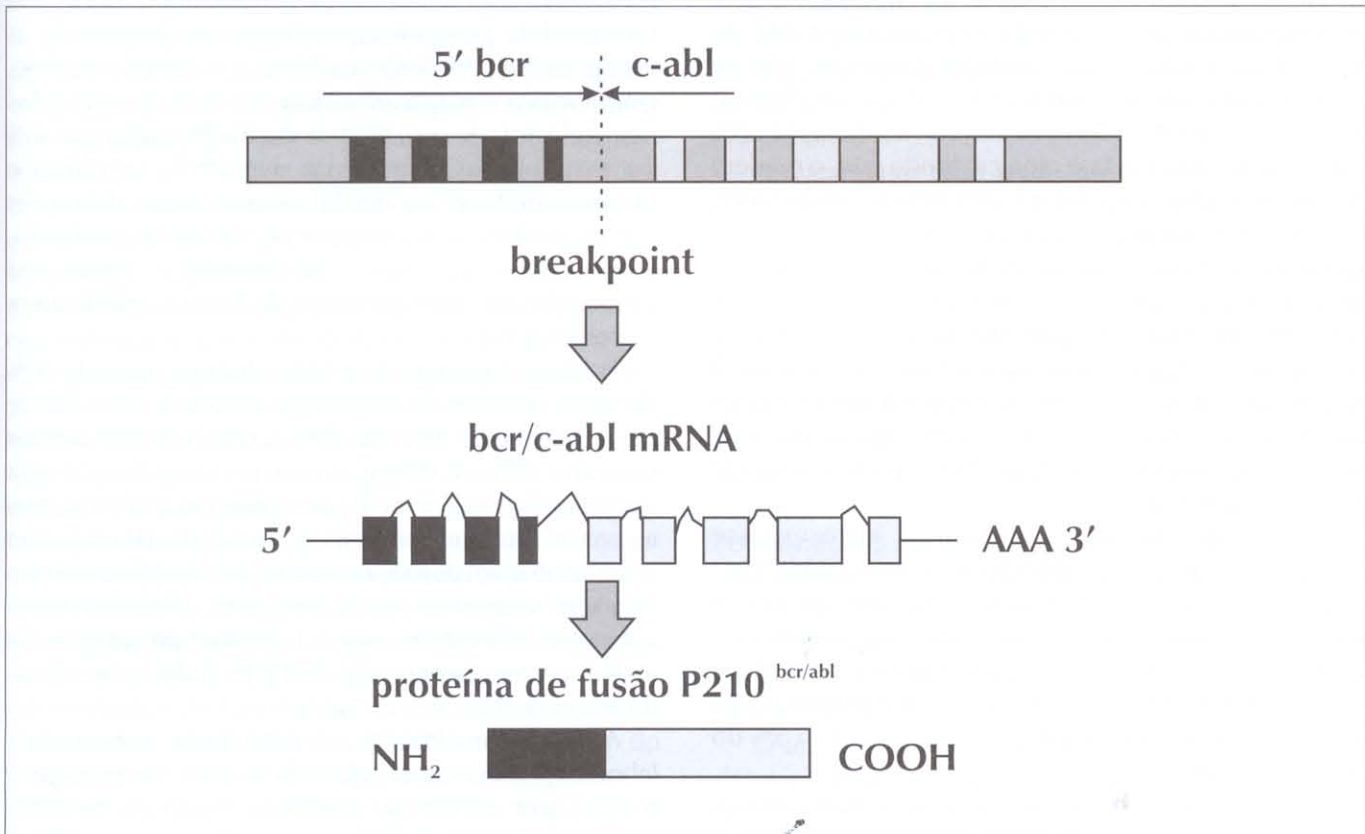


Figura 2: Região de quebra no gene *c-abl* do cromossomo 9 e no gene *bcr* no cromossomo 22. Formação do transcrito primário de RNA e tradução da proteína de fusão *bcr-abl* de 210 kDa e responsável pela leucemogênese

Características clínicas e laboratoriais da LMC:**Características laboratoriais**

A história natural da LMC é caracterizada por heterogeneidade na evolução da doença, apresentando curso trifásico⁽²⁾, sendo o evento primário a proliferação clonal da *stem cell* pluripotente hematopoiética que carrega o cromossomo Ph^(7, 16).

Inicialmente a doença é caracterizada por uma fase crônica, ou benigna, durante a qual a produção de progenitores celulares da linhagem mielóide e, ocasionalmente, precursores de plaquetas está elevada. A cinética de proliferação e as necessidades de fatores de crescimento destas células estão alteradas. Entretanto, elas chegam a se diferenciar gerando aumento no número total de células maduras, que podem apresentar alterações funcionais^(2, 10, 16, 17, 18).

O achado histológico mais importante na fase crônica da LMC é a leucocitose neutrofílica no sangue periférico, que pode variar de 20.000 a 500.000 leucócitos/mm³. Estão presentes células em todos os estágios maturativos, desde mieloblastos a neutrófilos segmentados, sendo que, os mieloblastos geralmente não excedem a 3% do total da contagem de leucócitos. Basofilia, eosinofilia e trombocitose estão geralmente presentes. A basofilia tem importância diagnóstica, pois é um dos parâmetros hematológicos que aumenta com a progressão da doença, já a eosinofilia, embora presente, não se correlaciona positivamente com a evolução da doença. A trombocitose está presente em aproximadamente 50% dos casos de LMC em fase crônica, sendo que, o número de plaquetas pode exceder a 1.000.000 de células/mm³.

A maioria dos pacientes com LMC em fase crônica apresenta anemia normocítica e normocrômica, embora, tenham sido relatados casos de pacientes que apresentaram concentrações normais ou elevadas de hemoglobina. A gravidade da anemia é proporcional ao grau de leucocitose, como é observado em processos proliferativos. Anormalidades morfológicas na série neutrofílica, como pseudo Pelger-Huet, podem aparecer no curso da doença⁽¹⁶⁾.

O mielograma da fase crônica apresenta-se hiper celular, com relação granulocítica: eritrocitária (G:E) entre 10:1 e 30:1. A eritropoiese está diminuída e o número de megacariócitos está normal ou aumentado. O número de eosinófilos e basófilos está normal ou levemente aumentado, de acordo com a proporção no sangue periférico, os mieloblastos não excedem 5% do total de células⁽¹⁶⁾.

O diagnóstico laboratorial da LMC é feito através exame citogenético ou exame molecular, como a reação de RT-PCR confirmatória para presença do cromossomo

Philadelphia do aspirado de medula óssea, associado ao mielograma. A imunofenotipagem para o diagnóstico da LMC não se apresenta como exame final para o diagnóstico.

Características Clínicas

A duração da fase crônica da LMC pode variar de vários meses a muitos anos, sendo em média de quatro anos^(2, 10, 16, 17, 18). Durante a fase crônica, podem ocorrer mutações adicionais nos precursores hematológicos que culminam com uma forma mais aguda da doença⁽¹⁷⁾. Essa nova fase pode ser classificada em fase acelerada e crise blástica, de acordo com critérios clínicos e laboratoriais.

A fase acelerada é caracterizada pela presença de 15% ou mais blastos ou 30% ou mais de blastos e promielócitos no sangue periférico, basofilia no sangue periférico de 20% ou mais, trombocitopenia com valores absolutos menores que 100.000 plaquetas/mm³.

A crise blástica é caracterizada por uma rápida proliferação de células blásticas imaturas, que são freqüentemente da linhagem mielóide, embora sejam encontrados blastos de origem linfóide em 30% dos casos. O aumento da proliferação de vários tipos de células hematopoiéticas na crise blástica da LMC é consistente com o modelo de Ferrata, que propõe uma única célula progenitora multipotente originando as linhagens linfóide (linfócitos T e B) e mielóide (eritróide, granulocítica e megacariocítica)^(2, 10, 16, 18). As alterações hematológicas da crise blástica são evidenciadas por 30% ou mais blastos, hipoplasia das séries eritróides e megacariocíticas na medula óssea, com alterações correspondentes no sangue periférico e, podendo, eventualmente, ser observadas alterações extramedulares com presença de blastos imaturos em outros órgãos⁽²⁾.

Epidemiologicamente a LMC abrange cerca de 20% de todos os casos de leucemia e a taxa de mortalidade desta patologia é de cerca de 1,5 para 100.000 pessoas por ano⁽¹⁶⁾. A doença ocorre com freqüência discretamente maior em homens que em mulheres, mas as manifestações clínicas e curso da doença são semelhantes em ambos os sexos. Ocorre raramente em crianças e adolescentes, somente 10% dos casos acometem indivíduos entre 5 e 20 anos de idade, e sua incidência representa cerca de 3% de todas as leucemias da infância⁽¹⁶⁾.

A LMC, geralmente, é detectada por exames laboratoriais de rotina, quando o paciente procura o médico por apresentar sintomas inespecíficos como fadiga, mal-estar, fraqueza, anorexia ou desconforto abdominal. O diagnóstico é feito através da associação

da história clínica, anamnese do paciente, resultados laboratoriais que incluem o hemograma, o mielograma e a confirmação diagnóstica através da análise citogenética, que detecta a presença do cromossomo Philadelphia, responsável pela proliferação mielóide anômala que é patognomônica da LMC⁽²⁾.

Os critérios utilizados para caracterizar a fase da LMC também são utilizados para determinar o prognóstico, conjuntamente com outros parâmetros, como por exemplo, a dose do(s) medicamento(s) administrado(s), esplenomegalia, presença de fibrose medular; blastos periféricos ou medulares acima de 10%, contagem global de leucócitos superior a 50.000/mm³, hematócrito inferior a 25% e contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³⁽²⁾.

Tratamento:

O tratamento da LMC não sofreu grandes alterações nos últimos 40 anos e diferentes autores têm proposto a associação de quimioterápicos para minimizar os efeitos da doença durante a fase crônica^(19, 20, 21). Em 1983 foi relatado o uso do interferon alfa (IFN- α) no tratamento de pacientes com LMC em fase crônica, cujo tratamento demonstrou boas perspectivas^(19, 20, 21).

A irradiação foi o primeiro tratamento para LMC, introduzida em 1902. Posteriormente foram utilizados os quimioterápicos, que se apresentavam mais efetivos do que a irradiação, dentre eles podemos citar o bussulfam, a hidroxiuréia, o melfalam, 6-mercaptopurina, clorambucil, 6-tioguanina, ciclofosfamida, dibromomanitol, demecolchicina, tiotepa, uracil mostarda, arabinsídeo-citarabina (ara-C) e recentemente o STI571. Apesar de se mostrarem mais efetivos do que a irradiação, os quimioterápicos não são curativos, apenas minimizam a morbidade da doença. O tratamento quimioterápico apresenta, portanto, caráter paliativo, e muitos pacientes não apresentam resposta ao tratamento.

Até 1980, o bussulfam e a hidroxiuréia eram os agentes terapêuticos para tratamento da LMC mais efetivos do que a irradiação e a outros medicamentos, como o melfalam, 6-mercaptopurina, clorambucil, 6-tioguanina, ciclofosfamida. Apresentavam menor toxicidade, menor custo e facilidade de administração (via oral)^(2,20).

O bussulfam é um ácido sulfônico, com ação alquilante, que induz granulocitopenia e tem atividade antileucêmica seletiva na LMC⁽²⁰⁾. A dose inicial de bussulfam administrada é de 4 a 6 mg/dia, via oral, até que o número de leucócitos se estabilize em 30.000/mm³. O efeito do medicamento persiste por dias a semanas, porém, o número de leucócitos pode se elevar. Portanto, é necessária a terapia de manutenção, que normalmente é de 2 mg, via oral, duas vezes por semana⁽¹⁶⁾.

A sobrevida média de pacientes tratados com bussulfam é de 30 a 42 meses⁽²⁰⁾. O bussulfam apresenta sérios efeitos colaterais, quando administrado prolongadamente, como a insuficiência adrenal, que provoca uma síndrome semelhante à Doença de Addison. Essa síndrome se manifesta por pigmentação da pele, fraqueza, febre e diarreia, fibrose pulmonar e aplasia de medula, que é a principal causa de morte entre os pacientes com LMC. A terapia com bussulfam não induz o desaparecimento do cromossomo Ph, nem é suficiente para causar supressão do clone anormal. O objetivo da terapia é controlar a fase crônica da doença e eliminar (ou pelo menos minimizar) a sua morbidade. Em alguns casos de sobrevida à aplasia medular, remissão prolongada da LMC pode ocorrer com desaparecimento do cromossomo Ph^(2, 16).

A hidroxiuréia, introduzida em 1960, é um inibidor da ribonucleotídeo-difosfato redutase, que leva à inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) sem interferir na síntese de ácido ribonucleico (RNA) ou de proteínas⁽²⁰⁾. Porém, como o bussulfam, a hidroxiuréia não leva à remissão citogenética da LMC⁽²⁰⁾.

No início do tratamento com hidroxiuréia, são administradas doses de 2 a 4 g/dia (40mg/Kg/dia), por via oral, dependendo da contagem de leucócitos^(16,21). A dose é diminuída quando a contagem atinge o valor de 20.000 leucócitos/mm³. As doses de manutenção da hidroxiuréia durante a fase crônica da doença, geralmente, estão entre 0,5 a 2,0 g por dia (10mg/Kg/dia), por via oral^(16,21).

O tratamento com hidroxiuréia não apresenta os efeitos colaterais observados com o bussulfam e, por essa razão, a hidroxiuréia tem sido utilizada como terapia de escolha. O principal efeito colateral é a exacerbação da supressão reversível da hemopoiese, freqüentemente acompanhada de eritropoiese megaloblástica⁽¹⁶⁾.

Outros fármacos como dibromomanitol, melfalam, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, demecolchicina, clorambucil, tiotepa e uracil mostarda são menos eficazes que o bussulfam e a hidroxiuréia^(16,20). Porém, estes agentes podem ser utilizados em combinação, ou em situações nas quais um dos componentes da mielopoiese não é controlado. Ciclofosfamidas ou tiopurinas são seguras em pacientes com trombocitopenia exacerbada. Por outro lado, tioguanina ou tiotepa são eficientes em trombocitose descontrolada⁽²⁰⁾.

O ara-C (arabinsídeo-citarabina) é um análogo da desoxicitidina, compete com o substrato da enzima DNA polimerase, incorporando-se à cadeia de DNA e interrompendo a replicação do DNA⁽²²⁾. O ara-C tem indicação como agente terapêutico da LMC, em especial,

na crise blástica da LMC ⁽²²⁾. O ara-C é administrado em infusões subcutâneas, em dose diária de 20mg/m² ⁽²³⁾.

Outro agente terapêutico que tem sido usado no tratamento de LMC é o IFN- α . Foi descrito que o IFN- α apresenta ação biológica antiproliferativa através do caminho da *janus kinases* (JAK) e *signal transducers and activators of transcription* (STAT). Esse caminho leva a ativação e a fosforilação das moléculas de STAT1 e STAT2 e transcrição de genes que codificam as proteínas p21 e caspase-1 que são responsáveis pela entrada das células em G0 e indução da apoptose ⁽¹⁹⁾.

O tratamento com IFN- α de pacientes com LMC pode levar a remissão hematológica, ou seja, diminuição da contagem de leucócitos até valores normais, em 70-80% dos pacientes em fase crônica ⁽¹⁶⁾. Diferentemente, da hidroxiuréia e do bussulfam, o IFN- α pode resultar em diminuição do número de células portadoras do cromossomo Ph, detectado por análise citogenética ^(16,20). Em 30% dos pacientes há diminuição na contagem de cromossomo Ph e em cerca de 15% dos pacientes há menos de 5% de células cromossomo Ph positivas, caracterizando, assim, resposta citogenética parcial. Resposta citogenética máxima, com ausência de células cromossomo Ph positivas, requer 12 a 18 meses de tratamento com IFN- α ⁽¹⁶⁾.

Em geral o tratamento com IFN- α é iniciado quando o número de 10.000 leucócitos/mm³ é atingido, após tratamento prévio com hidroxiuréia. A dose inicial de IFN- α é de 3 milhões de UI, três vezes por semana, por via subcutânea. A dose diária pode chegar até a 9 milhões de UI, dependendo da resposta do paciente, monitorada pela contagem total de leucócitos, que deve ser mantida em valores abaixo de 5000 leucócitos/mm³. A resposta citogenética é melhor se a dose for ajustada para manter as contagens entre 2.000 a 4.000 leucócitos/mm³, quando houver tolerância aos efeitos colaterais ⁽¹⁶⁾.

Os efeitos colaterais do tratamento com IFN- α incluem febre, anorexia, fadiga, insônia, depressão, trombocitopenia e uma variedade de desordens imunes incluindo hipotireoidismo, síndrome nefrótica, lupus sistêmico, artrite reumatóide, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva ⁽¹⁶⁾. No curso do tratamento com IFN- α podem ocorrer alterações de funções hepática e renal, com aumento da atividade sérica de transaminases (AST, ALT), aumento das concentrações séricas de bilirrubina total e frações, eletrólitos (sódio e potássio), uréia e creatinina. Esses parâmetros, avaliados antes e no curso do tratamento com IFN- α podem ser utilizados para monitorar os efeitos colaterais do medicamento sobre os pacientes ⁽¹⁶⁾.

O tratamento com IFN- α é descontinuado se é observada resistência à terapia demonstrada pela ausência de remissão hematológica parcial, caracterizada

por diminuição em 50% no número de leucócitos, ou ausência de remissão hematológica completa em 9 meses de tratamento, caracterizada pela normalização do número e das populações de leucócitos periféricos, ou na presença de efeitos adversos intoleráveis ^(16,21).

O tratamento com IFN- α não é curativo e mesmo pacientes com remissão citogenética completa são mantidos em terapia de manutenção com o IFN- α em doses de 3 milhões de UI três vezes por semana ^(16,21,24).

Estudo comparativo de Hehlmann e cols. ⁽²¹⁾ mostrou que a sobrevida relatada foi de 66 meses para pacientes tratados com IFN- α , 56,2 meses para pacientes tratados com hidroxiuréia e 45,4 meses para pacientes tratados com bussulfam. Outros estudos têm mostrado que o uso concomitante de ara-C (arabinosídeo-citarabina) com IFN- α é muito promissor, melhorando a sobrevida dos pacientes ⁽²³⁾.

Recentemente foi descrita uma série de inibidores de tirosina quinase, da classe 2-fenilaminopirimidina, com alta afinidade e especificidade para a proteína ABL. O STI571 apresenta alta afinidade para proteína ABL quinase, e a dois outros receptores tirosina-quinase relacionados, o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e o receptor de *stem cell factor* (c-Kit), e é essencialmente inativo contra serina-treonina-quinases e a maioria das tirosinas quinases ⁽²⁵⁾.

Estudos *in vitro* com cultura de células portadoras do gene *bcr-abl* demonstraram que o STI571 induz a apoptose destas células, por diminuição da expressão (*down regulation*) do Bcl-x_L, um membro da família Bcl-2, com atividade anti-apoptótica. O STI571 inibe também a atividade da proteína Akt quinase, responsável pela fosforilação da proteína Bad, um membro da família Bcl-2 com atividade pró-apoptótica. A proteína Bad na forma fosforilada perde sua função impedindo, assim, a apoptose. O STI571 inibe também o fator de transcrição NFkB, ativado por fosforilação pela proteína Akt, cuja fosforilação aumenta a expressão de genes que prolongam o tempo de vida da célula, pois interferem com os mecanismos de morte celular, e à diferenciação dos blastos leucêmicos por mecanismos moleculares ainda não elucidados ^(26,27).

O STI571 foi testado em avaliações pré-clínicas e clínicas para validar sua eficácia terapêutica e toxicidade, mostrando uso promissor como agente terapêutico para LMC ^(25, 26, 27), porém o STI571 não se mostrou eficaz em todos os pacientes tratados.

Outras formas de tratamento incluem a irradiação esplênica, que pode ser usada alternativamente em pacientes refratários a quimioterapia convencional e/ou em pacientes que apresentam moderada ou extrema esplenomegalia e pressão do baço sobre o trato gastrointestinal ⁽¹⁶⁾.

Uma possível medida cirúrgica é a esplenectomia, que não prolonga a fase crônica e aumenta a sensibilidade à quimioterapia padrão e intensiva. Embora, seja indicada a esplenectomia em pacientes com trombocitopenia não responsiva à quimioterapia e um grande aumento no volume do baço, morbidade pós-operatória por infecção, trombose ou hemorragia tem sido freqüentes ⁽¹⁶⁾.

Outra opção de tratamento é a técnica de leucoaférese, que pode temporariamente controlar a LMC e é especialmente indicada para dois tipos de pacientes: paciente com hiperleucocitose cuja citorredução rápida pode reverter sinais e sintomas de leucostasia e pacientes grávidas, principalmente, durante os primeiros meses de gravidez em que os quimioterápicos constituem alto risco para o feto ⁽¹⁶⁾.

O transplante de medula óssea (TMO) é a única terapia, até o presente, adequada que oferece uma possibilidade de cura da LMC. É mais efetiva quando realizada durante a fase crônica. Entretanto, entre os pacientes selecionados no estágio crônico, o TMO apresenta uma taxa de mortalidade precoce de aproximadamente 30%. Este risco só é aceitável para pacientes estadiados em categoria de alto risco com substancial perigo de transformação blástica e com possibilidade de morte em 2 anos ⁽¹⁷⁾. Em virtude disso, a análise prognóstica, baseada nos diferentes achados clínicos e laboratoriais, tem permitido estabelecer o estadiamento da doença e, conseqüentemente, fornecer embasamento para o planejamento racional do TMO ⁽²⁸⁾.

O TMO de doadores HLA compatíveis resulta em enxertamento e sobrevida projetada de 45 a 70% dos receptores. Entretanto, há o risco de recidiva em 20% dos casos. Como a mortalidade pós-transplante é alta (20-40%) a avaliação de indicadores prognósticos, como sexo, idade, tamanho do baço, entre outras, é necessária para a determinação do tempo ideal para o transplante na fase crônica ⁽¹⁶⁾.

Pacientes candidatos ao transplante de medula óssea devem ser preferencialmente tratados com hidroxiuréia ou IFN- α , uma vez que o tratamento com busulfan foi relatado desfavorecer o transplante posterior ⁽¹⁶⁾.

Células precursoras (*stem cells*) ou medula autóloga de pacientes com LMC têm sido usadas como terapia na crise blástica. Nesses casos a quimioterapia é utilizada para induzir a hemopoiese de precursores Ph negativos, na fase crônica da LMC, e *stem cells* normais são isoladas para ser infundidas nos pacientes durante a crise blástica. Assim, a redução da proliferação de células cromossomo Ph positivo *in vivo* com o tratamento com IFN- α e a possibilidade de cultivar e preservar células livres de cromossomo Ph permitem a obtenção de *stem cells*

autólogas que pode ser fornecida ao paciente tratado na fase crônica ^(16, 17).

Mecanismos de resistência a fármacos:

A falta de resposta aos quimioterápicos tradicionalmente utilizados para a terapia da LMC pode estar relacionada a mecanismos de resistência celular. Dentre os possíveis mecanismos de resistência, o aumento da metabolização dos fármacos, pelo aumento da expressão das isoenzimas do citocromo P450, responsáveis pela detoxificação de xenobióticos ^(22, 29) pode estar envolvido.

A superexpressão de proteínas alvo do fármaco, reduzindo o efeito terapêutico devido ao aumento da disponibilidade da proteína responsável pela patogênese da doença ^(29, 30) pode ser outro mecanismo de resistência.

Outro possível mecanismo é a expressão fenotípica da resistência multi-fármaco, ou *multidrug resistance* (MDR), definida como resistência cruzada a classes de fármacos diferentes incluindo aqueles que atuam em diferentes sítios-alvo ⁽³¹⁾. A base da MDR, em linhagens de células tumorais resistentes estudadas *in vitro*, foi atribuída a diminuição intracelular do fármaco devido ao aumento do seu efluxo através de proteínas de membrana celular ⁽³¹⁾. Foram descritas duas proteínas, em humanos, a glicoproteína P, de 170 kDa, codificada pelo gene MDR-1, localizado no cromossomo 7q31 e a proteína MRP, de 190 kDa, codificada pelo gene MRP localizado no cromossomo 16p13.1 ^(22, 29, 32, 33). Estas proteínas apresentam características comuns, pois pertencem a superfamília das proteínas transportadoras e utilizam a hidrólise do ATP para bombear seus substratos através da membrana contra um gradiente de concentração ⁽³¹⁾. Foi descrita em 1995 outra proteína, de 110 kDa, em cultura de células resistentes a fármacos e codificada pelo gene LRP, localizado no cromossomo 16p11.2 ⁽³⁴⁾. A superexpressão desta proteína foi associada a resistência, porém a amplificação gênica não foi detectada sugerindo que a superexpressão deve estar associada a ativação transcricional ou a estabilização do mRNA ⁽³⁴⁾. Essa proteína é responsável pelo transporte do fármaco do núcleo ao citoplasma reduzindo sua atividade farmacológica ⁽³⁴⁾.

O aumento da expressão de genes que codificam proteínas com alta afinidade pelo fármaco inibindo sua eficácia caracteriza-se como outro possível mecanismo de resistência celular ⁽³⁰⁾.

A resistência celular ao IFN- α tem sido atribuída à falha na expressão dos receptores do IFN- α (IFNAR), ao nível de mRNA, de síntese protéica ou de disponibilidade dos receptores na superfície celular, ou ainda, devido a presença de mutações ou a outras alterações

nos genes IFNAR^(35,36,37). A presença de anticorpos anti-IFN- α no sangue circulante também pode estar associada com a redução da eficácia terapêutica do IFN- α no tratamento da LMC⁽³⁸⁾.

A falta de resposta ao tratamento com STI571 não é conhecida. Entretanto, estudos *in vitro* de indução de resistência a este inibidor, em células leucêmicas humanas em cultura, mostraram que a amplificação gênica do gene *bcr-abl*, com conseqüente superexpressão da proteína de fusão foi a responsável pela indução de resistência⁽³⁰⁾. Outros autores mostraram que além da superexpressão da proteína BCR-ABL em células leucêmicas mantidas em cultura, ocorreu também a expressão exacerbada da glicoproteína P, codificada pelo gene *MDR-1*⁽²⁹⁾. Esses autores sugeriram que o aumento da expressão dos genes *bcr-abl* e *MDR-1* estão associados à falha na resposta ao tratamento com STI571.

A superexpressão do gene *LRP* com conseqüente aumento da produção da proteína codificada por este gene foram associadas a *MDR* em vários tipos de tumores malignos (câncer de pulmão e mama, fibrossarcoma e mieloma)⁽³⁹⁾. Outros autores, em investigações clínicas, sugeriram que a superexpressão do gene *LRP* está associada com prognóstico desfavorável em pacientes com leucemia mielóide aguda e carcinoma de ovário^(40,41).

A proteína *MRP* é outra proteína de membrana transportadora de conjugados de glutatona e que confere resistência a terapia anticâncer, em células que apresentam essa proteína em sua membrana, por transportar os quimioterápicos para fora da célula⁽⁴²⁾. A maioria dos agentes que revertem a resistência à terapia anticâncer mediada pela glicoproteína P (codificada pelo gene *MDR*) não reverte a resistência mediada pela *MRP*⁽³²⁾.

Discussão

Na atualidade a LMC é uma doença cuja terapia ainda é pouco eficaz. A única possibilidade de cura é o transplante de medula óssea, entretanto, dos pacientes diagnosticados com LMC somente 30% conseguem doador compatível, portanto 70% dos pacientes necessitam de terapia alternativa, que possibilitem uma melhor qualidade de vida. Por outro lado, os quimioterápicos utilizados apresentam graves efeitos colaterais,

aumentando, assim, a morbidade da doença. A administração de IFN- α tem sido utilizada como tratamento alternativo nos casos de LMC, com ou sem indicação para transplante. É importante ressaltar que o uso de IFN- α tem-se mostrado eficaz na redução das células cromossomo Ph positivo, porém os efeitos colaterais, em alguns casos, são intensos levando à intolerância medicamentosa. Em outros casos, os pacientes não respondem ao tratamento e a resistência pode ser atribuída a vários fatores, a falha na expressão do gene ou variação na taxa de expressão dos receptores de IFN- α , ou a presença de anticorpos anti-IFN- α presentes no sangue periférico dos pacientes em tratamento.

Com base no fato de que 95% dos pacientes portadores de LMC apresentam células cromossomo Ph positivo, que forma o gene híbrido *bcr-abl* que codifica a proteína de fusão BCR-ABL com propriedade de tirosina quinase aumentada, tem sido proposto o tratamento alternativo com o inibidor de tirosina quinase, o STI571, já comercializado tendo como nome comercial GLIVEC. Embora os protocolos de tratamento com STI571 tenham mostrado remissão hematológica e citogenética da LMC, este resultado não ocorreu em 100% dos pacientes. Portanto, estudos para avaliação e acompanhamento de pacientes tratados com STI571 devem incluir a investigação de possíveis mecanismos de desenvolvimento de resistência a esse novo fármaco. O estudo da expressão de genes associados com o mecanismo de ação do STI571 pode ser utilizado para compreender a resposta biológica e os possíveis mecanismos de resistência ao tratamento.

O aumento da expressão dos genes de resistência e sua associação ao fenótipo *MDR* vem sendo descritos em diversos tipos de câncer, e estudos *in vitro* de resistência ao STI571 mostraram o aumento da expressão do gene *MDR-1*. Portanto, a avaliação da expressão gênica dos genes envolvidos com o fenótipo *MDR* pode ser útil na compreensão da ação do STI571. Esses parâmetros poderiam futuramente serem utilizados como marcadores bioquímicos na indicação e no monitoramento terapêutico dos pacientes com LMC tratados com STI571.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lichtman M. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Williams W, Beutler E, Marshall AL, Barrys SC, Thomas JK. **Hematology**. 5ª ed. New York: Mc Graw-Hill; 1995.
2. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood** 1993;82(3):691-703.
3. Hamada G. Epidemiologia. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyashu H, Kowalski LP. **As bases da oncologia**. São Paulo: Lemar; 1998.
4. Yanagisawa K, Yamauchi H, Kaneko M, Kohno H, Hasegawa H, Fujita S. Suppression of cell proliferation and the expression of BCR-ABL fusion gene and apoptotic cell death in a new human chronic myelogenous leukemia cell line, KT-1, by interferon α . **Blood** 1998;91(2):641-8.
5. Bem-Neriah Y, Daley GQ, Mês-Masson AM, Owen NW, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the BCR-ABL hybrid gene. **Science** 1986;33:212-4.
6. Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM, Estrov Z. Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? **Blood** 1999;93(9):2755-9.
7. Silver RT, Woolf SH, Hellmann R, Appelbaum FR et al. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: develop for the American Society of Hematology. **Blood** 1999;94(5):1517-36.
8. Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giral S, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies. **American Society of Hematology** 2000.p.90-109.
9. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science** 1960;132:1497-500.
10. Larson RS, Wolf SN. Chronic myeloid leukemia. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.v2.
11. Shitvelman E, Batia L, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of ABL and BCR genes in chronic myelogenous leukemia. **Nature** 1985;315:550.
12. _____, Gale RP, Drazzen O, Berrebi A, Zaizov R, Kubonishi I, Miyoshi I, Canaani E. BCR-ABL RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood** 1987;69(3):971-3.
13. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human C-ABL protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. **Cell** 1984;37:1035.
14. _____, et al. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1 positive chronic myelogenous leukemia patients express C-ABL proteins with a common structural alteration. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985;82:1810-4.
15. Reuther JY et al. A requirement for NF κ B activation in BCR-ABL mediated transformation. **Genes & Dev** 1998;12:968-81.
16. Lichtman M. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Williams W, Beutler E, Marshall AL, Barrys SC, Thomas JK. **Hematology**. 5nd ed. New York: Mc Graw-Hill; 1995.
17. Howard OMZ et al. Interferon affects nuclear proteins in cells of clinically sensitive chronic myelogenous leukemia patients. **Blood** 1990;76(6):1117-30.
18. Ramakrishnan L, Rosenberg N. ABL genes. **Bioch Biophys Acta** 1989;989:209-24.
19. Voutsadakis IA. Interferon alpha and the pathogenesis of myeloproliferative disorders. **Med Oncol** 2000;17(4):249-57.
20. Talpaz M, Kantarjian HM, Kurzrock R, Gutterman J. Therapy of chronic myelogenous leukemia: chemotherapy and interferons. **Seminars in Hematol** 1988;25(1):62-73.
21. Hehlmann H, colaboradores. Randomized comparison of interferon alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 1994;84(12):4064-77.
22. Roithmann S. Fármacos antineoplásicos. In: Fuchs FD, Wannmacher L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
23. Guillot F. Chronic myeloid leukemia. In: Degos L, Linch DC, Löwenberg B. **Textbook of malignant hematology**. Martin Dunitz; 1999.
24. Korolkovas A. **Dicionário terapêutico**. Guanabara ed.1995/1996. Guanabara koogan; 1996.
25. Shindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. **Science** 2000;289:1938-42.
26. Cooper GM. **The cell: a molecular approach**. 2nd ed. Washington: MSM Press; 2000.
27. Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, Bhalla K. CGP57148B (STI571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes BCR-ABL-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. **Blood** 2000;96(6):2246-53.
28. Colamonici OR, colaboradores. Interferon alpha (IFN α) signaling in cells expressing the variant form of the type IFN receptor. **J Biol Chem** 1994;269:5660-5.
29. Mahon FX, Deininger MWN 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** 2000;96(3):1070-9.
30. Le Coutre P, Tassi E, Varela-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. **Blood** 2000;95(5):1758-66.
31. Broxterman HJ, Versantvoort CHM. Pharmacology of drug transport in multidrug resistant tumor cells. In: Kellen JA, editor. **Alternative mechanisms of multidrug resistance in cancer**. Boston: Birkhäuser; 1995.p.67-94.
32. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. **Science** 1992;258:1650-4.

33. Runge D, Köhler C, Kostrubsky VE, Jäger D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE, Michalopoulos GK. Induction of Cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1), multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. **Biochem Biophys Res Comm** 2000;273:333-41.
34. Slovak ML, Ho JP, Cole SPC, Deeley RG, Greenberger L, VriesEGE, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ. The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. **Cancer Res** 1995;55:4214-9.
35. Baron S, Dianzani F. The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections. **Antiviral Res** 1994;24:97-110.
36. Colomonici OR, Pfeffer LM. Structure of human interferon alpha-receptor. **Pharmac Ther** 1991;52:227-33.
37. _____, colaboradores. Correlation between interferon (IFN) alpha resistance and deletion of the IFN alpha/beta genes in acute leukemia cell lines suggests selection against the IFN system. **Blood** 1992;80:744-9.
38. Viscomi GC. Human leukocyte interferon alpha: structure, pharmacology and therapeutic applications. **Med Res Reviews** 1995;15:445-78.
39. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Danton WS, Van Heijningen THM, Van Kalken CK, Slovak ML, De Vries EGE, Van Der Valk P, Meijer CJLM, Pinedo HM. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Cancer Res** 1993;53:1475-9.
40. List A, Spier CS, Abbaszadegan M, Grogan TM, Gree JP, Wolf SN, Scheper RJ, Dalton WS. Non-P-glycoprotein (PGP) mediated multidrug resistance (MDR): identification of a novel drug resistance phenotype with prognostic relevance in acute myeloid leukemia (AML). **Blood** 1993;82:443a.
41. Izquierdo MA, Van Zee A, Vermorken J, Van Der Valk P, Belien JAM, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P, Meijer CJLM, De Vries EGE, Scheper RJ. Expression of new drug resistance associated marker LRP in ovarian carcinoma predicts poor response to chemotherapy and shorter survival. **J Natl Cancer Inst** 1997;87:1230-7.
42. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SPC, Deeley RG, Keppler D. The MRP genes encode an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. **J Biol Chem** 1994;269:27807-10.
43. Druker B. Status of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in

Correspondência para / correspondence to:

Ivanise M. M. Rebecchi
e-mail: rebecchi@usp.br