

# Mecanismos de Resistência aos Inibidores da Tirosina Cinase BCR-ABL



## Mechanisms of Resistance to BCR-ABL Kinase Inhibitors

Joana DIAMOND<sup>1</sup>, Maria Gomes da SILVA<sup>2</sup>  
**Acta Med Port 2013 Jul-Aug;26(4):402-408**

### RESUMO

Os doentes com leucemia mieloide crónica em fase crónica, tratados com imatinib mesilato obtêm na maioria dos casos uma resposta clínica. Contudo, nem todos atingem uma resposta ótima ao imatinib mesilato, ou sequer aos mais potentes inibidores da tirosina cinase de segunda geração. Além disso, algumas respostas não são duradouras e ainda não é claro se os inibidores podem ser interrompidos em doentes em remissão prolongada. Os mecanismos de resistência aos inibidores da tirosina cinase de segunda geração tornaram-se objecto de numerosos estudos. Esta revisão descreve o conhecimento actual sobre como e porquê as células de leucemia mieloide crónica podem desenvolver resistência aos inibidores da tirosina cinase de segunda geração.

**Palavras-chave:** Leucemia Mieloide Crónica; Imatinib; Inibidores da Tirosina Cinase; Resistência ao Tratamento.

### ABSTRACT

Since the introduction of imatinib mesylate for the treatment of chronic myeloid leukaemia, impressive clinical responses were observed in the majority of patients in chronic phase. However, not all patients experience an optimal response to imatinib mesylate or even to the more potent, second generation tyrosine kinase inhibitors. Furthermore, responses are not sustained in a number of patients, and it is yet unclear whether the inhibitors can be safely discontinued in patients who achieve long-term remission. The emergence of resistance to second generation tyrosine kinase inhibitors has become a significant problem that led to extensive studies on the causal mechanisms. This review will describe our current state of knowledge on why and how chronic myeloid leukaemia cells can develop resistance to second generation tyrosine kinase inhibitors.

**Keywords:** Drug Resistance; Neoplasm; Protein Kinase Inhibitors; Imatinib; Leukemia, Myelogenous, Chronic, BCR-ABL Positive.

### INTRODUÇÃO

Ainda que rara, a leucemia mieloide crónica (LMC) atraiu considerável atenção nas últimas décadas. Isto deve-se, em grande parte, ao facto de a terapia com imatinib mesilato (IM) dirigida a um alvo, a tirosina cinase Bcr-Abl, ter revolucionado o seu tratamento. Apesar da eficácia do IM, a persistência de doença mínima residual (DMR) e o aparecimento de resistências em parte dos doentes diminuíram o entusiasmo inicial. A investigação dos mecanismos de resistência ao IM desenvolveu-se devido à necessidade de melhorar a resposta e de prevenir ou ultrapassar esta resistência.<sup>1</sup>

A resistência pode ser definida como primária, que consiste na impossibilidade de atingir uma resposta citogenética significativa, ou secundária (adquirida), caracterizada pelo reaparecimento progressivo do clone leucémico após resposta inicial à droga. Em 2006 a European LeukemiaNet (ELN) propôs o uso de *guidelines* para definir os critérios de resposta ao IM, sendo a resistência dividida em dois grupos, 'resposta sub-ótima' e 'ausência de resposta'.<sup>2</sup> A continuação da terapêutica com IM provavelmente não tem benefício para os doentes sem resposta, enquanto nos casos com resposta sub-ótima pode ainda ser útil, se bem que com um prognóstico a longo termo menos favorável.<sup>2</sup> Estes critérios foram recentemente revistos de modo a incluir o impacto dos inibidores da tirosina cinase de segunda geração (TKIs) (nilotinib e dasatinib) no curso clínico.<sup>3</sup>

A resistência aos TKIs pode também ser classificada como BCR-ABL-dependente e independente. O primeiro grupo está bem caracterizado e compreende a emergência de clones leucémicos com mutações no domínio da tirosina cinase BCR-ABL e/ou sobreexpressão da proteína BCR-ABL, por amplificação do gene BCR-ABL. Os mecanismos que conduzem à resistência independente da BCR-ABL não são ainda claros, e na maior parte das vezes não têm sido reprodutíveis entre diferentes grupos de investigadores. Incluem, deficiências no transporte das drogas ao nível da membrana celular e a activação de vias de sinalização oncogénicas a jusante da proteína BCR-ABL.

Quando se detecta perda ou ausência de resposta a um TKI, deve primeiro confirmar-se a adesão ao tratamento. Marin et al.<sup>4</sup> demonstraram que este é um factor determinante para uma resposta molecular adequada em doentes sob terapêutica prolongada. Assim, antes de iniciar uma investigação sobre os mecanismos de resistência ao tratamento com TKI, é preciso ter a certeza de que as células são de facto expostas ao fármaco.

### Resistência ao Imatinib

#### Mutações no domínio da tirosina cinase

O aparecimento de mutações pontuais no domínio da tirosina cinase BCR-ABL é o mecanismo mais frequente de resistência adquirida, mas é muito raro nos doentes que

1. Laboratório de Hemato-Oncologia. Unidade de Biologia Molecular. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Lisboa. Portugal.

2. Serviço de Hematologia. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa. Portugal.

Recebido: 02 de Julho de 2012 - Aceite: 28 de Maio de 2013 | Copyright © Ordem dos Médicos 2013

nunca respondem ao IM. Salienta-se que estas mutações não são induzidas pela droga, mas antes, como acontece na resistência bacteriana aos antibióticos, os clones mutados, raros e pré-existent, são seleccionados devido à sua capacidade de sobrevivência e expansão na presença do inibidor, sobrepondo-se gradualmente às células sensíveis à droga.

As mutações podem ser classificadas em quatro grupos: (i) aquelas que impedem a ligação directa do IM; (ii) as localizadas no sítio de ligação ao ATP; (iii) as do *loop* de activação, que impedem que a cinase adquira a conformação que permite a ligação do IM; e (iv) as mutações no domínio catalítico (Fig. 1).

A substituição do aminoácido treonina por uma isoleucina na posição 315 da proteína ABL (tipo 1a), ou T315I, foi a primeira mutação detectada em doentes resistentes.<sup>5-7</sup> A fenilalanina 317 estabelece contacto com o IM, e a sua mutação para leucina (F317L) também conduz à resistência.

O *loop* de ligação do ATP (*Phosphate* ou *P-loop*) é outro local de agrupamento de mutações. Este domínio é constituído por uma sequência rica em glicina, altamente conservada, que abrange os aminoácidos 248-256 e interage com o IM através de ligações de hidrogénio e de van der

Waals.<sup>8</sup> Estas mutações modificam a flexibilidade do *P-loop* e destabilizam a conformação necessária para a ligação do IM.<sup>9</sup> As mais frequentes são as substituições G250, Q252, Y253 e E255.

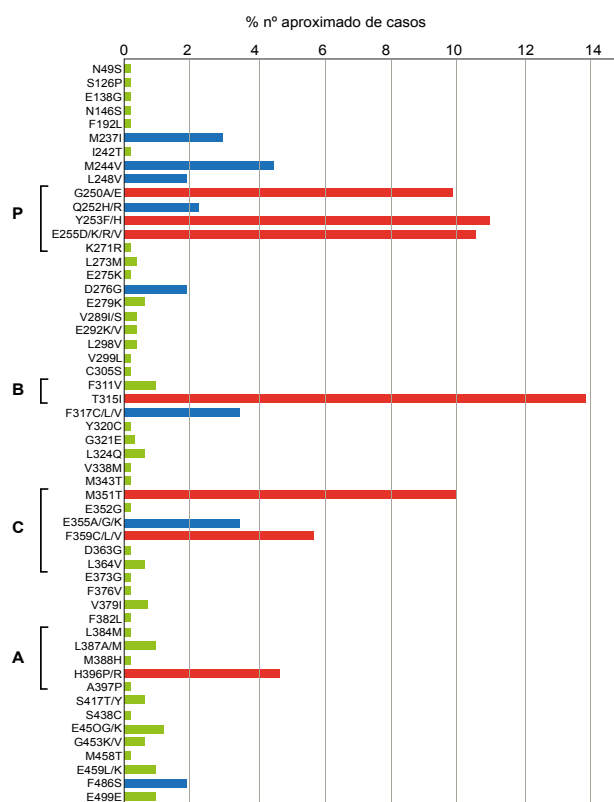
O *loop* de activação da cinase ABL começa no aminoácido 381 e pode adoptar uma conformação fechada (inactiva) ou aberta (activa). O IM liga-se à conformação activa forçando-a a transformar-se em inactiva.<sup>10,11</sup> As mutações no domínio de activação podem perturbar o balanço energético necessário para estabilizar a conformação fechada do *loop* e assim favorecer a conformação aberta activa.<sup>9</sup>

Finalmente, a substituição de alguns aminoácidos agrupa-se no domínio catalítico (aminoácido 350-363), muito próximo da base do *loop* de activação. Assim, as mutações nesta região podem também influenciar a ligação ao IM.<sup>9</sup> Até à data foram isoladas, em doentes com LMC resistentes ao IM, mais de 100 mutações pontuais que resultam na substituição de aproximadamente 50 aminoácidos no domínio da tirosina cinase ABL; prevê-se que este número aumente com a utilização de tecnologia de detecção cada vez mais sensível (Fig. 1). O grau de resistência varia conforme as mutações.<sup>12,13</sup>

Ao longo dos últimos anos foram publicadas diversas tabelas comparando os valores de IC<sub>50</sub> do IM dasatinib e nilotinib para as principais mutações BCR-ABL.<sup>14,15</sup> Importa salientar que existe uma enorme discrepância nos valores de IC<sub>50</sub> obtidos pelos diferentes grupos, provavelmente devido às diferentes metodologias de cálculo.<sup>16</sup> Além disso, deve ter-se presente que as mutações não são sempre o único mecanismo que conduz à resistência. De facto, a actividade anti-proliferativa de cada composto é medida *in vitro* usando uma linha celular e não tem em consideração a adesão do doente ao tratamento, a absorção da droga, o metabolismo, o transporte para o interior e para o exterior das células, a inactivação e excreção, ou ainda a interacção com outras drogas. Por esta razão, os valores de IC<sub>50</sub> não devem ser usados como único critério para a escolha de um TKI.

### Sobre-expressão do BCR-ABL

A sobre-expressão da proteína BCR-ABL, consequência da amplificação do gene BCR-ABL, foi descrita pela primeira vez em linhas celulares de LMC resistentes ao IM e expostas a concentrações crescentes do inibidor.<sup>17,18</sup> Esta amplificação conduz à resistência devido ao número cada vez maior de moléculas alvo que necessita de ser inibido pela dose terapêutica de IM. A sobre-expressão da BCR-ABL foi descrita em apenas cerca de 18% de todos os casos de resistência,<sup>5,8,19</sup> contudo, pode ser subestimada quando a detecção é baseada apenas na identificação citogenética da duplicação do cromossoma Ph. As células que expressam níveis elevados de BCR-ABL, são muito menos sensíveis ao IM, e desenvolvem mais rapidamente subclones resistentes, do que as que expressam níveis baixos de BCR-ABL.<sup>18</sup>



**Figura 1** – Incidência relativa das mutações no domínio da tirosina cinase associadas à resistência clínica ao IM. As sete mutações mais frequentes estão assinaladas a vermelho e as oito que se seguem a azul. Os aminoácidos mutados distribuem-se sequencialmente ao longo do domínio da cinase onde existe uma tendência para se agruparem nas sub-regiões indicadas como B (binding site), P (ATP ou phosphate binding site), A (activation loop) e C (catalytic domain).<sup>8-14</sup>

### Defeitos no transporte celular do imatinib

A resistência multidrogas (MDR) é, em muitos casos, mediada por um aumento da expressão da P-glicoproteína (Pgp), codificada pelo gene *MRD1* (*ABCB1*, ATP-binding cassette transporter 1), na superfície celular. A Pgp é uma bomba de efluxo que reduz a concentração intracelular da droga e que pode conduzir a níveis intracelulares subterapêuticos. Muitos estudos têm sugerido que o MRD desempenha um papel na resistência ao IM. Este inibidor, bem como outros TKIs, é substrato da Pgp e os seus níveis intracelulares são significativamente inferiores em células que expressam a Pgp.<sup>20-23</sup> Contudo, nos estudos clínicos não se encontraram tais associações e a inibição do MRD1 não parece aumentar o efeito do IM<sup>24-26</sup>; assim, o papel desta bomba de efluxo na resistência clínica ao IM permanece por esclarecer.

A proteína BCRP (breast cancer resistance protein), codificada pelo gene *ABCG2* (ATP-binding cassette transporter G2), tem sido também implicada na resistência ao IM. A bomba de efluxo BCRP/ABCG2, sobre-expressa em muitos tumores humanos, é expressa nas células estaminais da LMC.<sup>21,27-33</sup> Todavia, um estudo recente mostrou que o *ABCB1* e o *ABCG2* têm um papel funcional muito reduzido no transporte do IM em células primárias leucémicas CD34+, apesar dos altos níveis de expressão do mRNA destas proteínas.<sup>34</sup>

Contrariamente ao que acontece com as proteínas de efluxo, o *human organic cation transporter 1* (*OCT1*) transporta activamente o IM para o interior das células e a sua inibição diminui a concentração intracelular do fármaco.<sup>35</sup> O *OCT1* parece ser expresso em níveis significativamente mais elevados nas células mononucleadas de doentes com resposta citogenética completa, em comparação com respostas menos favoráveis.<sup>24,25</sup> Estas observações sugeriram que a expressão baixa de *OCT1* pode comprometer a remissão citogenética completa porque a concentração intracelular de IM é subterapêutica. O seguimento dos doentes incluídos no estudo TOPS (Tyrosine kinase inhibitor Optimization and Selectivity),<sup>36</sup> mostrou que a actividade funcional basal, mas não o nível de expressão da proteína *OCT1*, era preditiva da resposta à terapia em doentes com LMC tratados com IM na fase crónica.<sup>34,37</sup> Em contraste, estudos recentes corroboram os dados apresentados por Crossman et al,<sup>24</sup> e Wang et al<sup>25</sup>, que concluem que o nível de transcritos do *OCT1* nas células mononucleadas tem um valor prognóstico significativo na avaliação da resposta ao IM na LMC.<sup>4,26</sup> Não são claras as razões destas discrepâncias.

### Quiescência das células estaminais leucémicas

As células estaminais leucémicas quiescentes representam menos de 1% do total da população de células estaminais/progenitoras na LMC.<sup>27-29</sup> Estudos *in vitro* demonstraram que o IM tem um efeito antiproliferativo nas células estaminais da LMC, induzindo a paragem reversível do ciclo celular e a sua acumulação.<sup>27</sup> Contudo, estas células são resistentes à apoptose, mesmo quando os

níveis intracelulares do inibidor são similares aos obtidos em células maduras.<sup>30</sup> Esta observação repete-se na presença de inibidores muito mais potentes como o dasatinib e nilotinib.<sup>31-33</sup> Embora ainda não tenha sido demonstrado, parece provável a persistência de um reservatório constituído por uma população residual de células estaminais altamente resistentes e com a capacidade de restabelecer o clone leucémico, mesmo em doentes em remissão molecular.<sup>34-37</sup> Embora a resistência das células estaminais quiescentes pareça ser multifactorial, o efeito da descontinuação da terapia com TKIs em doentes estáveis, sem evidência de doença molecular, poderá esclarecer se as células estaminais dependem do BCR-ABL para sobreviver. Os resultados obtidos nos ensaios de interrupção do IM<sup>37-39</sup> mostraram que a maioria dos doentes recai poucos meses depois, enquanto cerca de 40% permanecem BCR-ABL-negativos durante todo o seguimento. Embora a insensibilidade das células estaminais persistentes na medula possa ser considerada como resistência, é importante distingui-la da resistência adquirida que torna os doentes refractários ao IM após tratamento prolongado. Neste último caso os mecanismos envolvem alterações genéticas permanentes que dão origem a sub-clones resistentes. Isto difere da resistência das células estaminais, cuja sensibilidade ao IM é restaurada quando saem da fase G0 e entram em divisão. Este restabelecimento da sensibilidade ao IM implica que quaisquer que sejam os mecanismos de resistência responsáveis, têm que ser epigenéticos e não codificados por genes amplificados ou mutados.<sup>40</sup>

O BCR-ABL inibe especificamente o CXCR4 (*CXC-motif chemokine receptor type 4*), receptor do SDF1 (*stromal cell-derived factor 1*, CXCL12), uma quimiocina produzida por células estromais, que medeia a quimiotaxia das células progenitoras CD34+ e desempenha um papel crítico na migração das células leucémicas para o estroma da medula óssea (MO). O IM é capaz de restaurar a expressão do CXCR4,<sup>43,44</sup> promovendo não só o *homing* das células leucémicas na MO, mas também a paragem do ciclo celular em G0-G1, a inibição da proliferação e o aumento da sobrevivência num estado quiescente, um fenótipo atribuído às células de LMC primitivas e refractárias à terapia com TKIs.<sup>31-33</sup> A inibição farmacológica do CXCR4 com um antagonista específico, plerixafor, resultou na reversão deste mecanismo de resistência primária.<sup>34</sup> O plerixafor, *in vitro*, diminui a migração das células BCR-ABL-positivas e reduz a adesão aos componentes da matriz extra-celular e às células do estroma. *In vivo*, a combinação plerixafor-nilotinib reduz a carga tumoral, sendo esta redução significativamente maior do que a observada com o nilotinib apenas.<sup>41</sup> A translação destas observações para a prática clínica pode vir a melhorar o tratamento da LMC.

Engler et al<sup>35</sup> demonstraram que a má resposta ao IM nos doentes com baixa actividade do *OCT1* (*organic cation transporter 1*) nas células mononucleadas não pode ser atribuída a uma menor captação da droga pelas células CD34+.<sup>35</sup> Mais recentemente Chomel et al<sup>42</sup> demonstraram que as células estaminais de LMC, bem como as células

percursoras mais diferenciadas, expressam substancialmente menos mRNA BCR-ABL do que as suas congêneres resistentes ao IM. Isto implica que um alto nível de expressão BCR-ABL é incompatível com a persistência de células estaminais leucémicas, enquanto baixos níveis de expressão contribuem para uma resistência intrínseca ao inibidor. Nestas condições, a erradicação da doença residual terá que passar por intervir nas vias de sinalização BCR-ABL-independentes. Além disso, os autores suportam a hipótese de que a pressão genética para mutar o BCR-ABL é muito baixa na LMC residual e persistente.<sup>42,43</sup> Esta ideia é confirmada pela observação clínica, já que os doentes que recaem depois de terem alcançado uma remissão molecular completa e terem interrompido o inibidor, mantêm a sensibilidade ao IM. Estas observações sugerem novas estratégias de erradicação da LMC residual e a necessidade de encontrar novas moléculas e vias de sinalização através das quais se possa estimular a expressão do BCR-ABL nas células estaminais quiescentes.

Recentemente, Puissant et al<sup>44</sup> mostraram, pela primeira vez, que a incubação contínua das células de LMC resistentes com TKIs conduz à selecção de células com um fenótipo bem definido e com maior capacidade de adesão, migração e invasão, quer *in vivo*, quer *in vitro*. As características destas células dependem estritamente da presença de IM ou nilotinib no meio de cultura; assim que a droga é retirada observa-se uma reversão do fenótipo.<sup>44</sup>

#### Microambiente estromal e resistência não-farmacológica

Uma das características da LMC é a adesão deficiente das células leucémicas ao estroma medular; a oncoproteína Bcr-Abl suprime a interacção celular mediada pelo CXCR4. A inibição da actividade da BCR-ABL com IM induz a expressão celular do CXCR4, resultando num aumento da migração das células leucémicas em direcção à MO. Paradoxalmente, esta migração promove a resistência não farmacológica aos inibidores de tirosina cinase.<sup>45</sup>

Os estudos *in vitro* foram corroborados por ensaios *in vivo*, em ratinhos.<sup>46-48</sup>

É sabido que a Src cinase Lyn interage com o eixo CXCL12/CXCR4 e é directamente activada pela p210 BCR-ABL. Tabe et al<sup>49</sup> demonstraram que o tratamento com TKI promove a redistribuição do CXCR4 na jangada lipídica, na qual se co-localiza com a forma activa fosforilada da Lyn (LynTyr396) (Fig. 2). Tanto a inibição da Lyn, como a depleção do colesterol, impedem a migração dos progenitores para o estroma, e o dasatinib (duplo inibidor da SCR/ABL cinase) induz uma migração muito reduzida.<sup>49</sup> Estas observações sugerem um novo mecanismo de resistência mediado pelo microambiente medular via modulação da jangada lipídica.<sup>49</sup>

#### Resistência aos inibidores de segunda geração

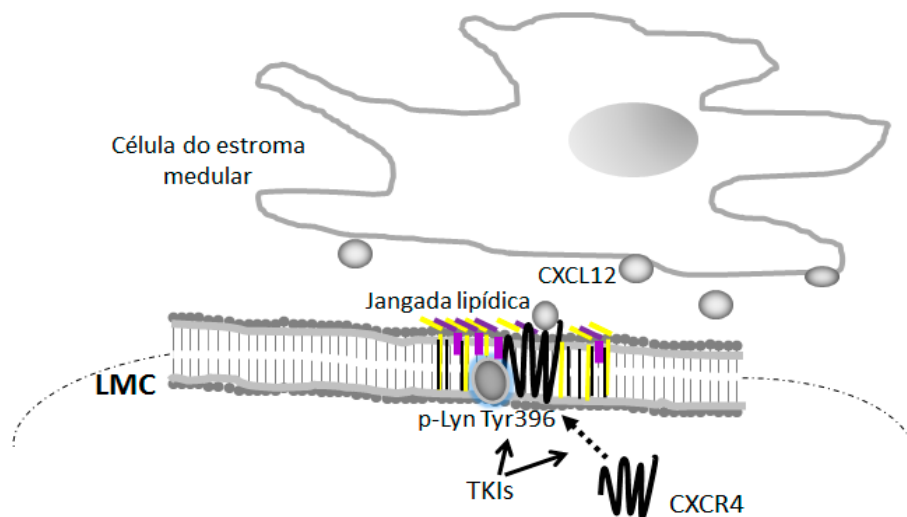
Nos últimos anos, estudos clínicos identificaram alguns mecanismos relevantes para a resposta e resistência ao nilotinib e dasatinib, utilizados como terapia de segunda ou terceira linha.<sup>13,16,50</sup>

#### Mutações no domínio da tirosina cinase

Após a falência do tratamento com IM, cerca de metade dos doentes que iniciam um inibidor de segunda geração apresentam mutações associadas à resistência. Alguns destes mutantes são também resistentes aos novos inibidores e, por esta razão, é fulcral identificar o tipo de aminoácido substituído antes de iniciar um novo TKI. Como mencionado, os ensaios de sensibilidade *in vitro* fornecem apenas uma indicação acerca da resposta de cada mutante aos vários TKIs. O seu verdadeiro valor para a prática clínica não foi validado, principalmente porque existem discrepâncias no grau de sensibilidade/resistência de cada mutante a qualquer das drogas.<sup>16</sup>

#### Dasatinib

O dasatinib (BMS-354825; Bristol-Myers Squibb) liga-



**Figura 2** – Localização do CXCR4 e activação da Lyn nas jangadas lipídicas. O IM promove a integração do CXCR4 na jangada lipídica, onde se co-localiza com a p-LynTyr396 activa e induz a migração das células leucémicas para as células do estroma da medula óssea, produtoras de CXCL12.



se quer à conformação activa, quer à inactiva da cinase Abl, necessita de poucos pontos de contacto com a Abl e tem mais afinidade para o domínio da cinase Abl que o IM. A actividade do dasatinib contra várias mutações que conferem resistência ao IM explica-se por não necessitar de interagir com os resíduos envolvidos naquelas mutações.

Este duplo inibidor SCR/ABL mostrou ser mais potente que o IM e capaz de inibir a proliferação e actividade cinásica em linhas celulares Bcr-Abl positivas em concentrações picomolares.<sup>51</sup> Estudos *in vivo*, confirmaram a sua actividade na inibição de células leucémicas e no prolongamento da sobrevivência de ratinhos portadores da BCR-ABL *wild-type* e com a mutação M351T; contudo, não é eficaz em portadores da mutação T315I.<sup>52</sup>

A resposta clínica ao dasatinib, após falência do IM, foi investigada num estudo envolvendo 1043 doentes com LMC tratados na fase crónica. A presença das mutações M351T e F317L na altura do início do dasatinib associou-se a respostas menos favoráveis.<sup>53-55</sup> De acordo com estas observações, foram detectadas em mutantes resistentes, ao dasatinib várias substituições que afectam o resíduo 317, incluindo a mutação F317L e variantes como F317V, F317I e F317S.<sup>10</sup> Outra mutação frequente associada à resistência clínica ao dasatinib é a V299L,<sup>16,56</sup> muito rara nos doentes tratados com IM.<sup>57</sup> As mutações V299L e F317F associaram-se preferencialmente à resistência ao dasatinib num estudo mutacional após terapia sequencial com o inibidor.<sup>53</sup> Os doentes portadores de um destes mutantes deverão ser tratados com nilotinib.

### Nilotinib

O nilotinib (AMN107, Novartis) foi desenhado como uma modificação química do IM e também inibe a actividade do Arg, Kit e PDGF $\alpha$  e  $\beta$ , mas não da SRC cinase.<sup>58</sup> Em linhas celulares BCR-ABL positivas revelou ser 10 a 50 vezes mais potente que o IM na inibição da proliferação e autofosforilação. À semelhança do dasatinib, inibe *in vitro* a proliferação da maioria dos mutantes BCR-ABL clinicamente relevantes, com excepção dos T315I. Contudo, como acontece para o IM e dasatinib, o grau de sensibilidade/resistência ao nilotinib varia de mutante para mutante. O nilotinib também mostrou ser superior ao IM na redução da carga leucémica e no prolongamento da sobrevivência de ratinhos transplantados com medula transfectada com a BCR-ABL e com os mutantes M351T e E255V.<sup>58</sup>

A sensibilidade *in vitro* ao nilotinib, correlaciona-se bem com a resposta clínica, com a notável excepção da substituição G250E, que tem sido classificada quer como sensível,<sup>14</sup> quer como resistente.<sup>15</sup> A maioria das mutações resistentes ao IM são sensíveis ao nilotinib,<sup>59-61</sup> embora em diferentes graus. A presença das mutações F359V/C, Y353H ou E255K/V quando da mudança para um segundo TKI, constituem indicação para a escolha do dasatinib e não do nilotinib, uma vez que os clones portadores destas mutações não respondem ao inibidor. De facto estas são também as mutações mais comuns encontradas durante o tratamento com nilotinib e estão associadas a uma alta

incidência de progressão.<sup>16,57</sup>

### Defeitos no transporte celular dos TKIs de segunda geração

A biodisponibilidade do dasatinib varia de 14% a 34%, provavelmente consequência de uma absorção incompleta e do metabolismo perissistémico.<sup>62</sup> Ao contrário do IM, a sua concentração intracelular não é significativamente afectada pela actividade do OCT1, uma vez que o seu efluxo celular é predominantemente passivo.<sup>20</sup> O dasatinib é substrato das proteínas transportadoras ABCB1 e ABCG2 (*ATP-binding cassette transporters B1 and G2*).<sup>20,63</sup> Contudo, estudos *in vivo*, em que se compararam ratinhos ABCB1 *knockout* e selvagens, não mostraram diferença na quantidade de dasatinib que permanece por absorver no tracto gastrointestinal, sugerindo que a Pgp não é provavelmente responsável pela baixa biodisponibilidade.<sup>64</sup> O nilotinib não necessita do OCT1 para ser internalizado pelas células leucémicas.<sup>65,66</sup>

### Outros mecanismos de resistência

A resistência ao nilotinib tem sido associada à sobre-expressão *in vitro* do BCR-ABL e/ou Pgp,<sup>67,68</sup> mas não existem, até à data, dados clínicos que sustentem esta hipótese. Mahon et al<sup>67</sup> demonstraram que existe uma 'sobre-regulação' da Lyn Src cinase em linhas celulares de LMC resistentes ao nilotinib. Globalmente, os resultados obtidos sugerem que as células BCR-ABL-positivas podem escapar ao efeito do nilotinib por mecanismos similares aos do IM.<sup>67</sup>

A p38 MAPK e os seus efectores podem desempenhar um papel crítico na prevenção da resistência ao dasatinib.<sup>68</sup> A exposição de células BCR-ABL positivas ao dasatinib activa a p38 MAPK. A inibição desta proteína ou o *knockdown* da sua expressão por siRNA, reverte a apoptose mediada pelo dasatinib, a paragem do ciclo celular e os efeitos anti-proliferativos. A identificação de compostos que activem a p38, independentemente da inibição do BCR-ABL, poderá ser uma nova forma para combater a resistência, incluindo a mediada pela T315I.<sup>68</sup>

*In vivo*, as células de LMC tratadas com TKIs encontram-se num ambiente rico em citocinas; *in vitro*, na presença de citocinas, verificou-se que nos progenitores CD34 + de doentes em fase crónica, a exposição breve a 100 mM de dasatinib não reduz as células CD34+-clonogénicas.<sup>69</sup> Ao contrário, na ausência de citocinas o dasatinib provoca a diminuição das CFUs em cerca de 70 a 80%. Se, nestas células progenitoras, a actividade do Jak for inibida verifica-se a retoma da sensibilidade à inibição pelo dasatinib independentemente da presença de citocinas. Estas observações sugerem que a inibição das vias de sinalização das citocinas, em conjunto com a inibição do BCR-ABL poderá ser explorada como terapia para a irradicação dos progenitores leucémicos.

Zhang et al<sup>70</sup> utilizaram o GNF-2, um inibidor da actividade da proteína BCR-ABL não competitivo para o bolso do ATP, em combinação com um TKI (inibidor ATP-competitivo), para alvejar a oncoproteína. Observou-se *in vitro* que

os GFN-2/5 podem cooperar com um inibidor ATP-competitivo para inibir a BCR-ABL e o mutante T315I. Foi também demonstrado que a utilização em simultâneo de um inibidor não-competitivo e um competitivo (TKI), reduz o número de clones resistentes que emergem com a exposição continuada a um único agente.<sup>71</sup>

## CONCLUSÃO

A introdução do IM no tratamento da LMC é um marco histórico na terapia direccionada contra um alvo molecular. Com a emergência de resistências a este inibidor, tornou-se claro que só um conhecimento profundo dos mecanismos moleculares da resistência permitiriam o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos e um controlo prolongado da doença num maior número de doentes. Temos actualmente um conhecimento razoável sobre o impacto das mutações no domínio da tirosina cinase Bcr-Abl como a principal causa de resistência adquirida ao IM e, no caso

de alguns mutantes, da refractoriedade aos inibidores de segunda geração. Contudo, o conhecimento sobre a natureza e mecanismos de outros fenómenos subjacentes à resistência aos TKIs, em doentes que não apresentam mutações na tirosina cinase, permanece fragmentado. No futuro a investigação será direccionada para o estudo das propriedades biológicas das células leucémicas e dos factores que governam a sua sensibilidade a cada uma das drogas, tendo como objectivo potenciar a terapia dirigida na LMC.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não houve conflito de interesses na realização deste trabalho.

## FONTES DE FINANCIAMENTO

Os autores declaram a inexistência de fontes de financiamento externos.

## REFERÊNCIAS

- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108:28-37.
- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108:1809-20.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27:6041-51.
- Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*. 2010;28:2381-8.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293:876-80.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000;289:1938-42.
- Adrián FJ, Ding Q, Sim T, Valentza A, Sloan C, Liu Y, et al. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol*. 2006;2:95-102.
- Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16:2190-6.
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2:117-25.
- Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7374-9.
- Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veatch DR, Miller WT, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002;62:4236-43.
- Corbin AS, Rosee PL, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*. 2003;101:4611-4.
- Jabbour E, Soverini S. Understanding the role of mutations in therapeutic decision making for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46:S22-6.
- O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110:2242-9.
- Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistrini V, Perini P, Marega M, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol*. 2009;27:469-71.
- Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood*. 2009;114:5426-35.
- Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, 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;96:1070-9.
- Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong AS, Wong A, et al. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2005;65:8912-9.
- Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galletta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*. 2003;4:75-85.
- Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, Varadi A, Sarkadi B, Keri G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1587:318-25.
- Hiwase DK, Saunders V, Hewett D, Frede A, Zrim S, Dang P, et al. Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3881-8.
- Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, Varadi A, Sarkadi B, Keri G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1587:318-25.
- Widmer N, Colombo S, Bucclin T, Decosterd LA. Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. *Blood*. 2003;102:1142.
- Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003;101:2368-73.
- Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L, Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood*. 2005;106:1133-4.
- Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:258-64.
- Hatzieremia S, Jordanides NE, Holyoake TL, Mountford JC, Jorgensen HG. Inhibition of MDR1 does not sensitize primitive chronic myeloid leukemia CD34+ cells to imatinib. *Exp Hematol*. 2009;37:692-700.
- Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*. 2004;104:2940-2.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, et al. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2

- (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res.* 2004;64:2333-7.
30. Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Varady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Váradi A, et al. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol.* 2004;65:1485-95.
  31. Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EA, de Bruijn EA, Guetens G, et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol Ther.* 2005;4:747-52.
  32. Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Wielinga P, van Tellingen O, Schinkel AH, et al. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.* 2005;65:2577-82.
  33. Jordanides NE, Jorgensen HG, Holyoake TL, Mountford JC. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood.* 2006;108:1370-3.
  34. Hu S, Franke RM, Filipinski KK, Hu C, Orwick SJ, de Bruijn EA, et al. Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res.* 2008;14:3141-8.
  35. Engler JR, Frede A, Saunders VA, Zannettino AC, Hughes TP, White DL. Chronic myeloid leukemia CD34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low OCT-1 activity. *Leukemia.* 2010;24:765-70.
  36. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood.* 2004;104:3739-45.
  37. Tang M, Gonen M, Quintas-Cardama A, Cortes J, Kantarjian H, Field C, et al. Dynamics of chronic myeloid leukemia response to long-term targeted therapy reveal treatment effects on leukemic stem cells. *Blood.* 2011;118:1622-31.
  38. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood.* 2007;110:4064-72.
  39. Ross DDM, Grigg A, Schwarzer A. The majority of chronic myeloid leukaemia patients who cease imatinib after achieving a sustained complete molecular response (CMR) remain in CMR, and any relapses occur early [abstract]. *Blood.* 2008;112 Abstract 1102.
  40. Barnes D J, Melo JV. Primitive, Quiescent and Difficult to Kill: The Role of Non-Proliferating Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Cell Cycle.* 2006;5:2862-6.
  41. Weisberg E, Azab AK, Manley PW, Kung AL, Christie AL, Bronson R, et al. Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia.* 2012;26:985-90.
  42. Chomel JC, Sorel N, Guilhot J, Guilhot F, Turhan AG. BCR-ABL expression in leukemic progenitors and primitive stem cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2012;119:2964-5.
  43. Burchert A, Neubauer A, Hochhaus A. Too much BCR-ABL to live on, but to little BCR-ABL to die on? *Blood.* 2012;119:2965.
  44. Puissant A, Dufies M, Fenouille N, Ben Sahra I, Jacquel A, Robert G, et al. Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness. *J Mol Cell Biol.* 2012;4:207-2.
  45. Jin L, Tabé Y, Konoplev S, Xu Y, Leysath CE, Lu H, et al. CXCR4 upregulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:48-58.
  46. Fei F, Stoddart S, Muschen M, Kim YM, Groffen J, Heisterkamp N. Development of resistance to dasatinib in Bcr/Abl-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24:813-20.
  47. Elrick LJ, Jorgensen HG, Mountford JC, Holyoake TL. Punish the parent not the progeny. *Blood.* 2005;105:1862-6.
  48. Parameswaran R, Yu M, Lim M, Groffen J, Heisterkamp N. Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist. *Leukemia.* 2011;25:1314-23.
  49. Tabé Y, Jin L, Iwabuchi K, Wang RY, Ichikawa N, Miida T, et al. Role of stromal microenvironment in nonpharmacological resistance of CML to imatinib through Lyn/CXCR4 interactions in lipid rafts. *Leukemia.* 2011;26:883-92.
  50. Engler JR, Frede A, Saunders V, Zannettino A, White DL, Hughes TP. The poor response to imatinib observed in CML patients with low OCT-1 activity is not attributable to lower uptake of imatinib into their CD34+ cells. *Blood.* 2010;116:2776-8.
  51. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)-1H-imidazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem.* 2004;47:6658-61.
  52. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004;305:399-401.
  53. Cortes J, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, et al. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood.* 2007;110:4005-11.
  54. Müller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, et al. Chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood.* 2009;114:4944-53.
  55. Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, et al. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 2006;66:5790-7.
  56. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood.* 2009;114:2168-71.
  57. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia.* 2006;20:1767-73.
  58. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.* 2005;7:129-41.
  59. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 2006;354:2542-51.
  60. Kantarjian H, O'Brien S, Talpaz M, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, et al. Outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia post-imatinib mesylate failure. *Cancer.* 2007;109:1556-60.
  61. le Coutre P, Ottmann OG, Giles F, Kim DW, Cortes J, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2008;111:1834-9.
  62. Apperley JF. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007;8:1116-28.
  63. Lagas JS, van Waterschoot RA, van Tilburg VA, Hillebrand MJ, Lankheet N, Rosing H, et al. Brain accumulation of dasatinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by elacridar treatment. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2344-51.
  64. Kamath AV, Wang J, Lee FY, Marathe PH. Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of dasatinib (BMS-354825): a potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61:365-76.
  65. Davies A, Jordanides NE, Giannoudis A, Lucas CM, Hatzieremia S, Harris RJ, et al. Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34(+) chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia.* 2009;23:1999-2006.
  66. Eadie L, Hughes TP, White DL. Nilotinib does not significantly reduce imatinib OCT-1 activity in either cell lines or primary CML cells. *Leukemia.* 2010;24:855-7.
  67. Mahon FX, Hayette S, Lagarde V, Belloc F, Turcq B, Nicolini F, et al. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res.* 2008;68:9809-16.
  68. Morinaga K, Yamauchi T, Kimura S, Maekawa T, Ueda T. Overcoming imatinib resistance using Src inhibitor CGP76030, Abl inhibitor nilotinib and Abl/Lyn inhibitor INNO-406 in newly established K562 variants with BCR-ABL gene amplification. *Int J Cancer.* 2008;122:2621-7.
  69. Dumka D, Puri P, Carayol N, Lumby C, Balachandran H, Schuster K, et al. Activation of the p38 Map kinase pathway is essential for the antileukemic effects of dasatinib. *Leuk Lymphoma.* 2009;50:2017-29.
  70. Hiwase DK, White DL, Powell JA, Saunders VA, Zrim SA, Frede AK, et al. Blocking cytokine signaling along with intense Bcr-Abl kinase inhibition induces apoptosis in primary CML progenitors. *Leukemia.* 2010;24:771-8.
  71. Zhang J, Adrián FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE, et al. Targeting wild-type and T315I Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-site inhibitors. *Nature.* 2010;28:501-6.