UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ROBERTA BITENCOURT MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM INIBIDORES DE TIROSINA CINASE

VITÓRIA

2013

ROBERTA BITENCOURT MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM INIBIDORES DE TIROSINA CINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iuri Drummond Louro

Co-orientadora: Dra. Ilana Zalcberg Renault

VITÓRIA

2013

ROBERTA BITENCOURT MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM INIBIDORES DE TIROSINA CINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 06 de março de 2013.

Prof. Dr. Iuri Drummond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Dra. Ilana Zalcberg Renault
Instituto Nacional de Câncer
Co-orientador(a)

Dra. Sandra Lucia Ventorin von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Paola Alejandra Cappelletti
Instituto Nacional de Câncer

VITÓRIA

2013

RESUMO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada por uma alteração citogenética conhecida, o cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultado da translocação recíproca t(9;22)(q34;q11). O gene de fusão *bcr-abl* codifica uma proteína com atividade tirosina cinase constitutiva que desregula vias de transdução de sinais ligadas à proliferação, apoptose e diferenciação celular. A evolução natural da LMC vem sendo alterada a partir do desenvolvimento dos inibidores de tirosina cinase (ITC). O imatinibe (Glivec®, Novartis) foi o primeiro ITC aprovado para o tratamento da LMC. A atualização de oito anos do estudo internacional randomizado do interferon e imatinibe (IRIS), ratificou a eficácia e a segurança do uso de imatinibe a longo prazo com uma sobrevida global de 85% e uma sobrevida livre de evento de 81%. Entretanto, algumas mutações no domínio cinase BCR-ABL conferem resistência a um ou mais ITC influenciando a escolha da terapia subsequente como no caso de uma mutação T315I, que é altamente resistente ao imatinibe. Apesar de múltiplos fatores contribuírem para a resistência ao imatinibe, a presença de mutação é mais prevalente e tem sido a mais investigada. Diante disso, foram selecionados para análise de mutação, pacientes portadores de um fenótipo de resistência de dois hospitais da região da grande Vitória, ES. Também foi desenvolvido um banco de dados para LMC que permite relacionar informações clínicas e laboratoriais de citogenética e biologia molecular, facilitando o acompanhamento de pacientes com LMC, bem como a compreensão da evolução da doença.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica, Inibidores de Tirosina Cinase, Mutação.

ABSTRACT

The chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by a cytogenetic alteration known as Philadelphia chromosome (Ph), a result of reciprocal translocation t (9; 22) (q34; q11). The resulting fusion *bcr-abl* gene encodes a protein with tyrosine kinase constitutive activity that deregulates signal transduction inducing proliferation, apoptosis, and cellular differentiation. The natural evolution of CML is currently changing with the development of tyrosine kinase inhibitors (TKI). Imatinib (Gleevec ®, Novartis) was the first TKI approved for the treatment of CML. The eight-year update of the international randomized study of interferon and imatinib (IRIS), confirmed the efficacy and safety of imatinib in the long term with an overall survival of 85% and an event-free survival of 81%. However, some mutations in the kinase domain BCR-ABL confer resistance to one or more TKI, influencing the choice of therapy, as in the case of a T315I mutation, which is highly resistant to imatinib. Although many factors contribute to the resistance to imatinib, the presence of mutations is more prevalent and has been further investigated. Therefore, were aimed to perform mutation analysis in patients with a resistant phenotype of two cancer reference hospitals in Vitoria, ES, Brazil. We also developed a CML database relating clinical information and laboratory cytogenetics and molecular biology results, facilitating the monitoring of CML patients, as well as the understanding of disease progression.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Tyrosine Kinase Inhibitors, Mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Translocação t(9;22)(q34;q11).....13
Figura 1.1 - Localização dos pontos de quebra do gene *abl* e *bcr*.....16
Figura 1.2a - Estrutura cristalográfica do domínio cinase.....17
Figura 1.2b - Estrutura cristalográfica do domínio cinase em complexo com ITC.....18
Figura 1.3 - Sensibilidade das mutações para o dasatinibe e nilotinibe determinado por ensaios *in vitro* de proliferação de células.....21
Figura 1.4 - Fluxograma para análise de mutação em pacientes com LMC tratados com o imatinibe.....23
Figura 3.6 - Produto da 2ª fase do RT-PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL.....34
Figura 4. 1a - Visualização geral da interação entre os dados.....38
Figura 4.1b – Formulário de cadastro de paciente com LMC.....38
Figura 4.3a - Eletroferograma da mutação T315I.....46
Figura 4.3b - Eletroferograma da mutação F317L.....47
Figura 4.3c - Eletroferograma da mutação Y253F.....48
Figura 4.3d - Sobrevida global do grupo estudado.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para definição das fases da LMC.....14
Tabela 1.3a - Prováveis mecanismos de resistência ao ITC.....19
Tabela 1.3b - Metodologias para detecção das mutações BCR-ABL.....21
Tabela 1.4a - Definição de Resposta Hematológica, Citogenética e Molecular.....22
Tabela 1.4b - Definição de Resposta Ótima, Subótima e Falha Terapêutica.....23
Tabela 1.5 - Monitoramento da resposta ao imatinibe.....25
Tabela 3.1a - Informações selecionadas para construção do banco de dados.....29
Tabela 3.1b - Informações das planilhas criadas para o banco de dados.....30
Tabela 3.6a - Padronização da reação de RT-PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL.....34
Tabela 3.6b - Condição experimental da amplificação do domínio cinase BCR-ABL.....34
Tabela 4.2a - Características do grupo de estudo.....43
Tabela 4.2b - Evolução do grupo de estudo durante o tratamento com ITC.....44

LISTA DE SIGLAS

abl	do inglês *Abelson leukemia vírus*
ASO-PCR	PCR alelo especifico
ATP	adenosina trifosfato
bcr	do inglês *breakage cluster region*
bcr-abl	gene de fusão formado pelos genes *bcr* e *abl*
BCR-ABL	proteína tirosina cinase BCR-ABL
CB	crise blástica
cDNA	DNA complementar
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
Cg	citogenética
c-kit	do inglês *tyrosine-protein kinase Kit*
CRM	Conselho Regional de Medicina
DEPC	dietilpirocarbonato
DHPLC	do inglês *Denaturing high performance liquid chromatography*
DNA	do inglês *deoxyribonucleic acid*
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etileno di-amino tetra acético
ERK	do inglês *extracellular-signal-regulated kinases*
F	feminino
FA	fase acelerada

LISTA DE SIGLAS *(continuação)*

FC	fase crônica
FISH	hibridização *in sit*u com fluorescência
FT	falha terapêutica
GELN	grupo europeu *LeukemiaNet*
HCl	ácido clorídrico
ID	código de identificação do paciente
IC_{50}	concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRIS	do inglês *International Randomized Study of Interferon and STI571*
ITC	inibidores de tirosina quinase
JAK	do inglês *janus kinase*
KCl	cloreto de potássio
LMC	leucemia mielóide crônica
M	masculino
MAPK	do inglês *mitogen-activated protein kinases*
M-*bcr*	do inglês *major bcr*
m-*bcr*	do inglês *minor bcr*
µ-*bcr*	micro *bcr*
MDR-1	do inglês *multidrug resistance protein 1*
MO	medula óssea
$MgCl_2$	cloreto de magnésio

LISTA DE SIGLAS *(continuação)*

Nº	número
OTC-1	do inglês *ornithine carbamoyltransferase*
Pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato
PCR	do inglês p*olymerase chain reaction*
PDGFR	do inglês p*latelet-derived growth factor receptor*
Ph	cromossomo *Philadelphia*
PI3K	do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*
P-loop	do inglês *phosphate-binding loop*
Primer	do inglês *short DNA fragment*
RAS	do inglês *rat sarcoma virus*
RCLB	tampão de lise de eritrócitos
RH	resposta hematológica
RHC	resposta hematológica completa
RCg	resposta citogenética
RCgC	resposta citogenética completa
RCgP	resposta citogenética parcial
RCgMe	resposta citogenética menor
RCgMi	resposta citogenética mínima
RCgN	resposta citogenética nula
RM	resposta molecular

LISTA DE SIGLAS *(continuação)*

RMC	resposta molecular completa
RMM	resposta molecular maior
RNA	do inglês *ribonucleic acid*
RNAase	do inglês *ribonuclease*
RNAm	RNA mensageiro
RQ-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RS	resposta subótima
RT	transcrição reversa
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
SP	sangue periférico
SRC	do inglês *short for sarcoma*
STAT5	do inglês *signal transducer and activator of transcription 5*
SUS	Sistema Único de Saúde
TMO	transplante de medula óssea
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
UF	Unidade Federativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 Gene *bcr-abl* 15

1.2 Inibidores de tirosina cinase 16

1.3 Mecanismos de resistência 19

1.4 Resposta ao tratamento com inibidores de tirosina cinase 22

1.5 Monitoramentos do tratamento com inibidores de tirosina cinase 24

1.6 Mutações na era dos inibidores de tirosina cinase 25

2 OBJETIVOS 28

2.1 Objetivo geral 28

2.2 Objetivos específicos 28

3 METODOLOGIA 29

3.1 Desenvolvimento do banco de dados 29

3.2 Seleção do grupo de estudo 30

3.3 Processamento das amostras e extração de RNA 31

3.4 Síntese de cDNA 32

3.5 Avaliação da qualidade da amostra para estudo de mutação 32

3.6 RT PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL 33

3.7 Purificação, seqüênciamento e análise de sequências 35

3.8 Análise estatística 36

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

4.1 Banco de dados 37

4.2 Características clínicas do grupo estudado 40

4.3 Descrição dos pacientes que apresentaram mutação no domínio cinase BCR-ABL 45

5 CONCLUSÕES 50

6 REFERÊNCIAS 51

7 ANEXOS 57

7.1 Trabalho apresentado no I Simpósio Sul Americano de Cancerologia 57

7.2 Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Hemoterapia e Hematologia 59

7.3 Artigo publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 60

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia mielóide crônica (LMC) decorre de uma expansão clonal de células progenitoras hematopoiética que resulta em um aumento de células mielóides, eritróides e plaquetas no sangue periférico e em hiperplasia mielóide observada na medula óssea [SAWYERS, 1999]. É caracterizada por uma alteração citogenética conhecida, o cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultado da translocação recíproca t(9;22)(q34;q11) [NOWELL & HUNGERFORD, 1960; ROWLEY,1983].

Em nível molecular a translocação justapõe o protoncogene *abl* (*Abelson Leukemia Vírus*) no cromossomo 9 [BARTRAM et al., 1983] ao gene *bcr* (*Breakage Cluster Region*) no cromossomo 22 (Figura1) [GROFFEN et al., 1984]. O gene de fusão *bcr-abl* codifica uma proteína com atividade tirosina cinase constitutiva que desregula vias de transdução de sinais ligadas a proliferação, apoptose e diferenciação celular [THIJSEN et al., 1999]. As principais vias implicadas na transdução de sinais e ativadas direta ou indiretamente a partir da ativação da proteína cinase intracitoplasmática BCR-ABL são: RAS (*rat sarcoma virus)*, MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Jak (*janus kinase*), STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), via WNT e beta catenina e via Hedgehog. Algumas destas vias são ativadas por mecanismos independentes da tirosina cinase BCR-ABL [REN, 2005; STEELMAN et al., 2004; O'HARE et al., 2009].

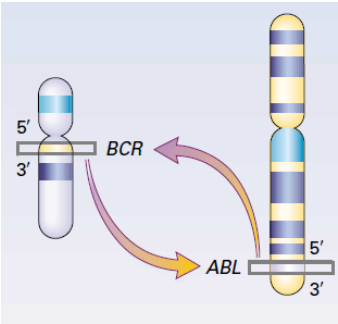

Figura 1: Translocação t(9;22)(q34;q11).
Fonte: FADERL, S. et al., 1999.

A LMC foi a primeira doença humana em que uma anomalia genética específica - o cromossomo *Ph* – foi associada à patogenia de uma leucemia [FADERL et al., 1999]. A evolução natural da LMC quando não tratada é trifásica (tabela 1) [BACCARANI et al., 2006] sendo a fase inicial crônica (FC) de caráter indolente. A doença progride para uma fase acelerada (FA), que evolui para uma fase leucêmica, a crise blástica (CB) que pode ser de origem linfóide ou mielóide [SAWYERS, 1999]. Atualmente, esta dinâmica foi alterada a partir do desenvolvimento dos inibidores de tirosina cinase (ITC) [VISANI et al., 2010].

O imatinibe (Glivec®, Novartis) foi o primeiro ITC aprovado para o tratamento da LMC. A atualização de oito anos do estudo internacional randomizado do interferon e imatinibe (IRIS), ratificou a eficácia e a segurança do uso de imatinibe a longo prazo com uma sobrevida global de 85% e uma sobrevida livre de evento de 81%. No estudo 55% dos pacientes permaneceram em tratamento com imatinibe e 45% suspenderam o uso devido a eventos adversos (6%), resposta insatisfatória (16%), encaminhamento para o transplante de medula óssea (3%), óbito (3%) e outros motivos (17%) [DEININGER et al., 2009].

Tabela 1: Critérios para definição das fases da LMC

Fase Crônica	Fase Acelerada	Crise Blástica
Ausência das características da FA e CB	Blastos 10-19% no SP ou MO Basófilo < 20% no SP Trombocitopenia persistente não relacionada com a terapia <100x10^9/L Aumento do baço e leucócitos não responsivo a terapia Evidência Cg de evolução clonal não presente ao diagnóstico	Blastos >30% no SP ou MO Proliferação blástica extra medular

FA: fase acelerada, CB: crise blástica, SP: sangue periférico, MO: medula óssea, Cg: citogenética.
Fonte: BACCARANI et al., 2006.

1.1 Gene *bcr-abl*

O gene *abl* tem 11 exons e em condições normais codifica a proteína ABL que apresenta três domínios de homologia SRC (*short for sarcoma*) (SH1, SH2, SH3). O domínio SH1 exerce a função de tirosina cinase, enquanto os domínios SH2 e SH3 permitem a interação com outras proteínas e regulam a atividade tirosina cinase do gene *abl* [FADERL et al., 1999]. Na formação do gene de fusão *bcr-abl* o local da quebra em *abl* é pouco variável e ocorre dentro de um segmento com mais de 300kb na região 5' terminal, podendo ocorrer entre o exon 1b e exon 1a, em direção 5' ao exon 1b, ou em direção 3' ao exon 1a.

Em contraste, a região de quebra do gene *bcr* é mais variável podendo ocorrer em três diferentes regiões (figura 1.1). Na maioria dos pacientes de LMC o gene *bcr* apresenta ponto de quebra numa região de 5,8kb, conhecida como *major-bcr* (M-*bcr*) entre os exons 12-16 (conhecidos como b1-b5). A maioria das quebras associadas ao M-*bcr* acontecem entre o exon 13 ou 14 (conhecidos como b2-b3). Os demais pontos de quebra ocorrem no exon 1 (e1a2), em uma região conhecida como *minor-bcr* (m-*bcr*) e entre o exon 19 e 20 (e19a2) na região micro-*bcr* (µ-*bcr*). Independentemente da localização exata do ponto de quebra do gene *abl*, o *splicing* alternativo do RNAm resulta na fusão do gene *bcr* ao exon 2a do gene *abl*, formando um RNAm do tipo e13a2 (isoforma b2a2) e/ou e14a2 (isoforma b3a2), ambas as isoformas codificam uma proteína quimérica de 210kd (p210BCR-ABL) [Melo, 1996].

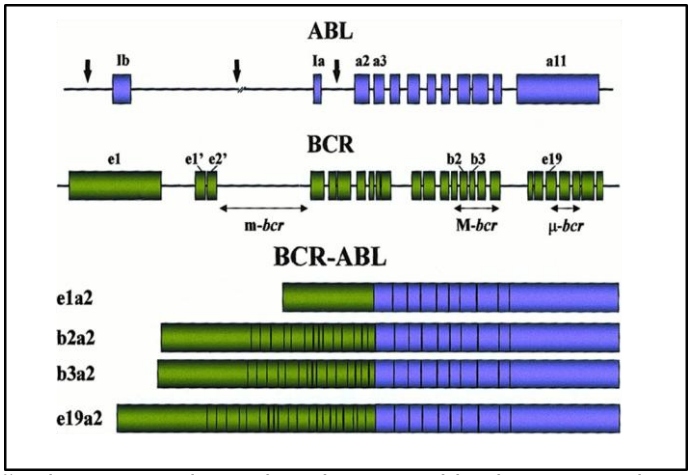

Figura 1.1: Localização dos pontos de quebra do gene *abl* e *bcr*. Ponto de quebra na região M-*bcr* ocorre entre o exon 13 e 14 (b2a2 e/ou b3a2). Ponto de quebra na região *minor*-bcr (m-*bcr*) ocorre no exon 1 (e1a2). Ponto de quebra na região *micro-bcr* (μ-*bcr*) ocorre entre o exon 19 e 20 (e19a2).
Fonte: DEININGER, GOLDMAN & MELO, 2000.

1.2 Inibidores de tirosina cinase

O domínio cinase da proteína apresenta uma estrutura bilobal (lobo N-terminal e lobo C-terminal) e entre os dois lobos situa-se o local de ligação para adenosina trifosfato (ATP). Dentro do domínio cinase, quando a alça de ativação é fosforilada, determina-se que a proteína cinase está ativa. Em tirosinas cinases, o sítio de ativação da fosforilação geralmente é um resíduo de tirosina localizada no meio da alça, que uma vez fosforilada pode interagir eletrostaticamente com resíduos de arginina vizinhos, resultando na estabilização e abertura da conformação do alça. Essa conformação da alça permite acesso do peptídeo ao sítio de ligação. Quando a alça de ativação não é fosforilada (sua forma inativa) pode assumir várias conformações estáveis, geralmente bloqueando o sítio de ligação do peptídeo e inibindo a habilidade de ligação ao ATP [SCHINDLER et al.,2000].

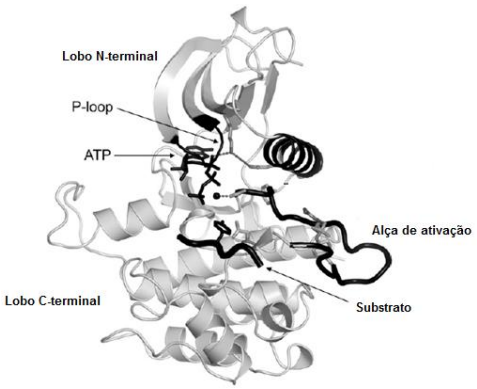

Figura 1.2a: Estrutura cristalográfica do domínio cinase
Fonte: NAGAR,2007.

O imatinibe atua através da inibição competitiva pelo sítio de ligação da (ATP) ao domínio cinase BCR-ABL na sua conformação inativa. Isso conduz à inibição da fosforilação de proteínas tirosinas cinases envolvidas na transdução de sinais decorrentes da ativação da proteína BCR-ABL. A atividade tirosina cinase do PDGFR (p*latelet-derived growth factor receptor*) e do c-kit (*tyrosine-protein kinase kit*) também pode ser inibida pelo imatinibe [DRUKER & LYDON, 2000].

Dasatinibe (Sprycel ®, Bristol- Myers Squibb) e Nilotinibe (Tasigna®, Novartis) são ITC de segunda geração aprovados para o tratamento, em segunda linha, de pacientes que apresentaram resistência ou intolerância ao tratamento com imatinibe [EIRING et al., 2011]. O dasatinibe inibe a tirosina cinase BCR-ABL, as cinases da família SRC (*short for sarcoma*), do PDGFR e do receptor c-kit. Ele atua no sítio do ATP em ABL e não depende, para a sua ação, se a proteína está na forma ativa ou inativa, sendo 325 vezes mais potente que o imatinibe em células que expressam o gene *bcr-abl* [LOMBARDO et al., 2004; SCHITTENHELM et al., 2006; O'HARE et al., 2005].

O nilotinibe foi desenvolvido com uma estrutura derivada do imatinibe. Portanto, o nilotinibe se liga a uma conformação inativa da proteína BCR-ABL, ocupando uma região análoga ao que seria ocupada pelo ATP na conformação ativa da enzima. Assim como o imatinibe, o nilotinibe também inibe a atividade tirosina cinase do PDGFR e do receptor c-kit. Em células que expressam o gene *bcr-abl*, o nilotinibe é 20 vezes mais potente que o imatinibe [GOLEMOVIC et al., 2005; WEISBERG et al., 2005]. Semelhante ao imatinibe e o dasatinibe, o nilotinibe também é metabolizado

pelo fígado, principalmente pelo citocromo P450, apresentando potencial para interações medicamentosas [MCFARLAND & WETZSTEIN, 2009].

Algumas mutações no domínio cinase conferem resistência elevada a um ou mais ITC. Em particular, a mutação T315I confere resistência aos três ITC (imatinibe, nilotinibe e dasatinibe). A localização da mutação T315I elimina a ligação de ponte de hidrogênio necessária para a alta afinidade do imatinibe, nilotinibe e dasatinibe, além da alterar a topografia do sítio de ligação do ATP (figura 1.2). Na busca de um ITC que atue na presença da mutação T315I, o ponatinibe foi desenvolvido com a incorporação de múltiplos pontos de contato para a conformação inativa do ABL e para a mutação T315I, conferindo uma alta afinidade e potência. Também atua contra outras mutações resistentes ao imatinibe e inibe a família SRC cinase, do PDGRF e c-kit [O'Hare et al., 2009]. O ponatinibe não inibe aurora cinase, como o MK-0457, o que o distingue de outros inibidores T315I em desenvolvimento [HARRINGTON et al., 2004]

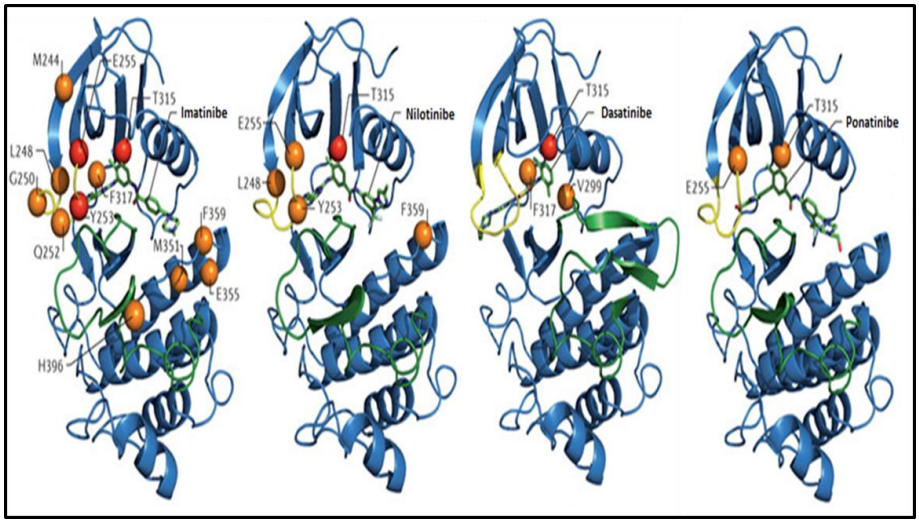

Figura 1.2b: Estrutura cristalográfica do domínio cinase em complexo com ITC. O ITC está indicado em verde no sítio de ligação do ATP. As mutações que conferem resistência aos ITCs *in vitro* foram indicadas em laranja e vermelho, representando resistência moderada ou alta respectivamente. Cada ITC é suscetível a um conjunto diferente de mutações. Em comparação com imatinibe, o ponatinibe apresenta menor vulnerabilidade a mutações no domínio cinase.
Fonte: O' HARE et al., 2012.

1.3 Mecanismos de resistência

A resistência ao imatinibe pode ser dividida em primária (refrataridade ou intolerância) quando se observa falta de eficácia a partir do início do tratamento com imatinibe e secundária (adquirida) quando uma resposta inicial é perdida devido à perda de eficácia durante o tempo de tratamento com imatinibe [HOCHHAUS & LA ROSÉE, 2004]. Aproximadamente 35% dos pacientes com LMC desenvolvem resistência durante o tratamento com imatinibe [HOCHHAUS et al, 2009].

Uma série de mecanismos foi proposta para explicar a resistência ao imatinibe e aos outros ITC, como por exemplo, aumento do número de cópias do gene *bcr-abl*, mutação no domínio cinase BCR-ABL, inibição incompleta da proteína BCR-ABL, super expressão de MDR-1 (*multidrug resistance protein 1*) e redução do transportador OCT-1 (*ornithine carbamoyltransferase*) (tabela 1.3a) [HOCHHAUS et al., 2002; MILOJKOVIC & APPERLEY, 2009].

Tabela 1.3a: Prováveis mecanismos de resistência ao ITC

Independente do gene *bcr-abl*	**Dependente do gene *bcr-abl***
Redução do transportador OCT1	Aumento da expressão do gene *bcr-abl*
Aumento de MDR-1	Mutação no domínio cinase BCR-ABL
Evolução clonal	

Fonte: MILOJKOVIC & APPERLEY, 2009.

Apesar de múltiplos fatores contribuírem para a resistência ao imatinibe, a presença de mutação no domínio cinase BCR-ABL é mais prevalente e tem sido o mais investigado [SOVERINI et al., 2011]. Apesar de mais de noventa diferentes substituições de aminoácidos tenham sido descritas, aproximadamente 85% dos casos positivos para mutação apresentam um dos quinze tipos de mutação relacionados: T315I, Y253F/H, E255K/V, M351T, G250E, F359C/V, H396R/P, M244V, E355G, F317L, M237I, Q252H/R, D276G, L248V, F486S [APPERLEY, 2007].

As mutações podem ser classificadas em quatro grupos, com base na estrutura cristalográfica do ABL: a)mutações que prejudicam diretamente a ligação do

imatinibe ao domínio catalítico da proteína tirosina cinase BCR-ABL; b) mutações na alça de fosfato (*loop-P*); c) mutações na alça de ativação, impedindo que a proteína tirosina cinase BCR-ABL atinja a conformação inativa necessária para ligação ao imatinibe; e d) mutações dentro do domínio catalítico com impacto sobre a atividade da proteína tirosina cinase BCR-ABL. A propósito, mesmo mutações fora do domínio cinase podem levar a autofosforilação, por estabilizarem a molécula na conformação ativa que impede a ligação ao imatinibe [ERNST et al., 2011].

Em dois importantes trabalhos - *O' Hare e colaboradores* e *Redaelli e colaboradores* – a concentração, *in vitro*, de um ITC necessário para inibir a atividade tirosina cinase BCR-ABL na presença de mutações foi determinada (figura 1.3). Cada mutação foi classificada como sensível, sensibilidade intermediária ou resistente em função da concentração necessária do ITC para inibir 50% da proliferação do BCR-ABL mutado (IC_{50}) *in vitro*, consequentemente, quanto menor o IC_{50} do ITC, mais potente ele será [O' HARE, EIDE & DEININGER, 2007; REDAELLI et al., 2009]. Entretanto, a interpretação da sensibilidade para algumas mutações de estudos *in vitro* não é simples, visto que uma mesma mutação dependendo do estudo é descrita como resistente ou sensível ao mesmo inibidor como, por exemplo, a mutação G250E [BRANDFORD, MELO & HUGHES, 2009].

A identificação de algumas mutações pode influenciar a escolha da terapia subsequente porque no caso de uma mutação T315I, que é altamente resistente ao imatinibe, dasatinibe e nilotinibe, o único tratamento farmacológico, o ponatinibe, está em desenvolvimento em estudos de fase 1/2. Nas mutações V299L, T315A, ou F317L/V/I/C, nilotinibe é provavelmente mais eficaz do que o dasatinibe. Nas mutações Y253H, E255K / V, ou F359V/C/I, dasatinibe é provavelmente mais eficaz do que nilotinibe. Nas outras mutações provavelmente o dasatinibe e nilotinibe são igualmente eficazes [SOVERINI et al., 2012]

O' Hare e colaboradores		*Redaelli e colaboradores*	
Dasatinibe	**Nilotinibe**	**Dasatinibe**	**Nilotinibe**
T315I	T315I	T315I	T315I
T315A	Y253H	V299L	E255V
F317V	E255V	E255K	E255K
V299L	E255K	L248V	F359V
E255V	F359V	F317L	**G250E**
F317L	Y253F	**G250E**	Y253F
E255K	Q252H	E255V	**H396R**
Q252H	T315A	Q252H	L248V
F359V	V379I	F486S	Q252H
L387M	**F317L**	L384M	**H396P**
G250E	L387M	E279K	L384M
E355G	**G250E**	H396R	**F317L**
Y253F	**H396R**	Y253F	E279K
Y253H	**H396P**	F359V	D276G
M244V	M244V	D276G	F486S
H396R	F311L	H396P	V299L
F311L	M351T	M351T	G398R
M351T		G398R	M351T
V379I			
H396P			

Figura 1.3: Sensibilidade das mutações para o dasatinibe e nilotinibe determinado por ensaios *in vitro* de proliferação de células. Em negrito estão as mutações que apresentam diferenças na classificação entre os estudos. No estudo de O'Hare e colaboradores: vermelho indica resistente; amarelo, sensibilidade intermediária; e verde, sensível. No estudo de Redaelli e colaboradores: vermelho indica altamente resistente; laranja, resistente; amarelo, sensibilidade intermediária e verde, sensível.
Fonte: BRANDFORD, MELO & HUGHES, 2009; REDAELLI et al., 2009; O' HARE, EIDE & DEININGER, 2007.

Várias metodologias (tabela 1.3b) foram implementadas para viabilizar a identificação de mutações, a exemplo do sequenciamento direto de Sanger, da cromatografia líquida de alta performance denaturante (DHPLC), da espectrometria de massa e da reação de cadeia da polimerase alelo-específico (ASO-PCR), todas elas variando na sensibilidade e especificidade [Alikian et al., 2012].

Tabela 1.3b: Metodologias para detecção das mutações BCR-ABL

Sensibilidade	Metodologias
15-25%	sequenciamento direto de Sanger
1%	cromatografia líquida de alta performance denaturante
0,05-0,5%	espectrometria de massa
0,01-0,001%	reação de cadeia da polimerase alelo-específico

Fonte: Alikian et al., 2012

1.4 Respostas ao tratamento com inibidores de tirosina cinase

A resposta ao tratamento com imatinibe é definida em função: a) da Resposta Hematológica (RH); b) da Resposta Citogenética (RCg); e c) Resposta Molecular (RM), tal como descrita na tabela 1.4a [BACCARANI et al., 2009]. Assim, o objetivo do tratamento com imatinibe é alcançar a RH Completa (RHC), a RCg Completa (RCgC) e a RM com redução ≥ 5 log (razão *bcr-abl/abl* ≤ 0,001%) (RMM^5) [CROSS et al., 2012].

Tabela 1.4a: Definição de Resposta Hematológica, Citogenética e Molecular

Resposta Hematológica	Resposta Citogenética	Resposta Molecular
RHC: Leucócitos < $10x10^9$/L Basófilo < 5% Ausência de mielócito, promielócito, mieloblasto na contagem diferencial Plaquetas < $450x10^9$/L	RCgC: 0% Ph RCgP: 1-35% Ph RCgMe: 36-65% Ph RCgMi: 66-95% Ph RCgN: >95% Ph	RMC: RM^4: razão *bcr-abl/abl* ≤ 0,01% $RM^{4,5}$: razão *bcr-abl/abl* ≤ 0,0032% RM^5: razão *bcr-abl/abl* ≤ 0,001% RMM: razão *bcr-abl/abl* ≤ 0,1%

RHC: resposta hematológica completa, RCgC: resposta citogenética completa, RCgP: resposta citogenética parcial, RCgMe: resposta citogenética menor, RCgMi: resposta citogenética mínima, RCgN: resposta citogenética nula, Ph: cromossomo *Philadelphia*, RMC: resposta molecular completa, RMM: resposta molecular maior, RM^4: resposta molecular com redução ≥ 4 log, $RM^{4,5}$: resposta molecular com redução ≥ 4,5 log e RM^5: resposta molecular com redução ≥ 5 log. **Fonte:** BACCARANI et al., 2009; CROSS et al., 2012.

De acordo com o tipo de resposta alcançada em diferentes momentos ao longo do tratamento, o Grupo Europeu LeukemiaNet (GELN) definiu varias categorias de resposta ao tratamento com imatinibe: resposta ótima, resposta subótima e falha terapêutica (tabela 1.4b).

A resposta ótima significa que não há indicação de que uma mudança no tratamento possa melhorar a sobrevida. A resposta subótima significa que o paciente ainda poderá ter um benefício a longo prazo, permanecendo com o mesmo tratamento, mas com chances reduzidas de alcançar uma resposta ótima, sendo passível da introdução de uma outra abordagem terapêutica. A falha terapêutica significa que é improvável que o paciente tenha uma resposta favorável, sendo considerado resistente ao tratamento com imatinibe. A resposta ao tratamento também se aplica

aos pacientes intolerantes ao imatinibe que iniciaram tratamento com dasatinibe ou nilotinibe. A resposta a esses fármacos são obtidas mais rapidamente [BACCARANI et al., 2009].

Tabela 1.4b: Definição de Resposta Ótima, Subótima e Falha Terapêutica

Tempo (meses)	Resposta Ótima	Resposta Subótima	Falha Terapêutica
3	RHC e RCgMi	RCgN	Menos que RHC
6	RCgP	Menos que RCgP	RCgN
12	RCgC	RCgP	Menos que RCgP
18	RMM	Menos que RMM	Menos que RCgC
qualquer momento	RMM estável ou melhorando	Perda da RMM ou Mutação*	Perda da RHC, Perda da RCgC, Mutação**, Progressão clonal

RHC: resposta hematológica completa, RCgN: resposta citogenética nula, RCgMi: resposta citogenética mínima, RCgP: resposta citogenética parcial, RCgC: resposta citogenética completa e RMM: resposta molecular maior. * sensível ao imatinibe, ** pouco sensível ao imatinibe.
Fonte: BACCARANI et al., 2009.

Hochhaus e colaboradores consideram qualquer suspensão da terapia com imatinibe por causa de evento adverso/valores laboratoriais anormais como progressão, o que não necessariamente indica progressão para a FA da LMC [HOCHHAUS et al., 2008].

A análise de mutação é recomendada em pacientes recém-diagnosticados em FA ou CB, no caso de falha terapêutica e em caso de resposta subótima ao imatinibe. *Soverini e colaboradores*, tomando como base as definições do GELN resumiram as recomendações para análise de mutação com base no nível de resposta alcançada ao longo do tratamento com imatinibe (figura 1.4b).

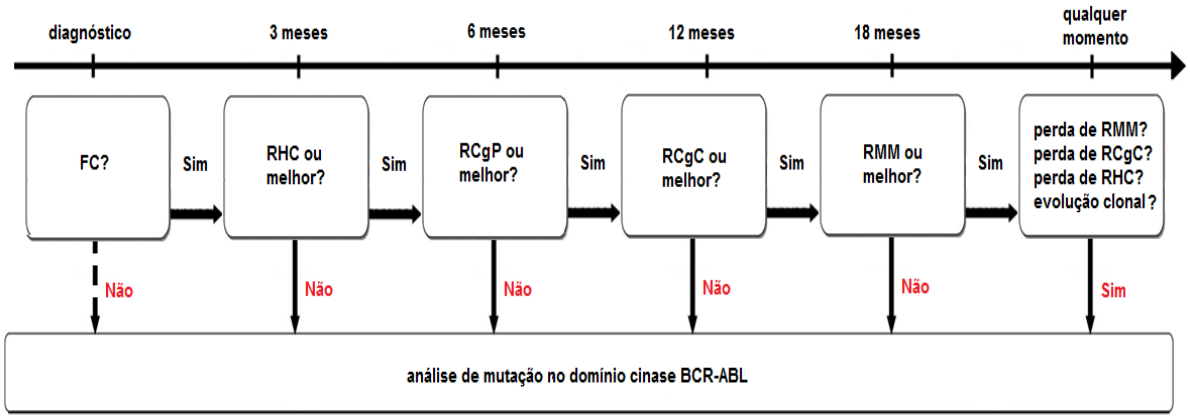

Figura 1.4: Fluxograma para análise de mutação em pacientes com LMC tratados com o imatinibe. FC: fase crônica, RHC: resposta hematológica completa, RCgP: resposta citogenética parcial, RCgC: resposta citogenética completa, RMM: resposta molecular maior.
Fonte: SOVERINI et al., 2012.

1.5 Monitoramentos do tratamento com inibidores de tirosina cinase

O monitoramento do tratamento com imatinibe abrange hemograma, citogenética, quantificação dos níveis de transcrito *bcr-abl* e análise de mutação do domínio cinase BCR-ABL (tabela 1.5). O hemograma é realizado a cada quinze dias até que a RHC seja alcançada e depois a cada três meses. A citogenética é necessária aos três e seis meses de tratamento e a cada seis meses até o alcance da RCgC. A técnica de análise de bandas de células em metáfase da medula óssea é preferida a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) porque os tipos de RCg foram definidos através da análise de banda. A quantificação nos níveis de transcrito *bcr-abl* através do PCR (*Polymerase chain reaction*) quantitativo em tempo real (RQ-PCR) é recomendada a cada três meses até o alcance de uma RM maior (RMM) e também é para monitoramento da cinética dos transcritos [BACCARANI et al., 2009].

Pacientes com resposta subótima ou com sinais de alerta precisam de uma monitoração mais frequente. Para monitoração do tratamento com ITCs de segunda e terceira geração, os exames necessários são os mesmos, mas uma maior frequência dos exames pode ser apropriada devido às respostas serem alcançadas mais rapidamente [BACCARANI et al., 2009].

A análise de mutação não é útil em pacientes recém-diagnosticados com LMC e em pré-terapia com ITC. Já em pacientes com níveis de *bcr-abl* crescente ou resistente à terapia com ITC, a análise de mutação pode identificar uma mutação desfavorável e contribuir para definição da próxima conduta [KANTARJIAN & CORTES, 2011].

Tabela 1.5: Monitoramento da resposta ao imatinibe.

Resposta	Descrição do Monitoramento
Hematológica	Ao diagnóstico, a cada 15 dias até a RHC e depois de confirmada a cada 3 meses ou antes se necessário.
Citogenética	Ao diagnóstico, aos 3 e 6 meses até RCgC e depois de confirmada a cada 12 meses. Sempre que ocorrer falha ao tratamento, anemia, leucopenia e trombocitopenia inexplicáveis.
Molecular (RQ-PCR)	A cada 3 meses até RMM e depois a cada 6 meses.
Análise de Mutação	Em Resposta Subótima ou Falha Terapêutica e antes de mudança de terapia.

RHC: Resposta Hematológica Completa, RCgC: Resposta Citogenética Completa, RMM: Resposta Molecular Maior e RQ-PCR: PCR quantitativo em tempo real
Fonte: BACCARANI et al., 2009.

1.6 Mutações na era dos inibidores de tirosina cinase

Jabbour e colaboradores avaliaram a presença de mutação no domínio cinase BCR-ABL em 169 de 217 pacientes (78%) com LMC resistentes ao imatinibe. Mutação no domínio cinase foi identificada em 86 (51%) pacientes após uma média de 25 meses (variação de 2-68 meses) desde o início da terapia com imatinibe e até o início da terapia com um ITC de segunda geração. Quarenta e um pacientes foram posteriormente tratados com dasatinibe e 45 pacientes com nilotinibe [JABBOUR et al., 2009]. Os pacientes apresentavam a idade mediana de 52 anos (variação de 17-80 anos). No começo do tratamento com imatinibe, 68 (79%) pacientes estavam em FC, 15 (17%) em FA e 3 (4%) em CB. A melhor resposta ao imatinibe em 43 pacientes foi a RHC, em 22 pacientes a RCgM e em 11 pacientes a RCgP [JABBOUR et al., 2009].

Sete pacientes apresentaram mais de uma mutação. A mutação G250E foi a mais freqüente, presente em 14 (16%) pacientes. Mutações no *P-loop* representaram 32% das mutações, a mutação T315I estava presente em 9 pacientes, representando 10% de todas as mutações [JABBOUR et al., 2009].

O estudo demonstrou que o tratamento com ITC de segunda geração, em pacientes resistentes ao imatinibe e portadores de mutações, resultou em RHC em 77% dos pacientes e RCgC em 52% dos pacientes. Pacientes com mutações de IC_{50}, intermediário e alto tiveram menores taxas de resposta e um risco maior de progressão quando comparados àqueles pacientes portadores de IC_{50} mais baixo. A associação da resposta com o IC_{50} foi menos evidente em fases avançadas. Os resultados reforçaram que dasatinibe é eficaz em pacientes que falharam ao nilotinibe e vice-versa. Isto é parcialmente verdade e varia de acordo com o tipo de mutação do paciente e sua sensibilidade *in vitro*, como por exemplo, a mutação F317L, na qual o nilotinibe é mais ativo do que o dasatinibe. Da mesma forma, o dasatinibe é mais ativo em pacientes portadores da mutação F359V [JABBOUR et al., 2009].

Já *Visani e colaboradores* relatam a importância de estudos baseados na prática clínica real de cada local para confirmação de dados declarados a partir de ensaios clínicos. Este grupo avaliou a eficácia e a tolerabilidade ao dasatinibe como terapia de segunda linha em 114 pacientes de LMC não incluídos em ensaios clínicos, resistentes ou intolerantes ao imatinibe [VISANI et al., 2010].

O tempo médio de uso do imatinibe foi de 36 meses (variação de 2-99 meses). Cento e sete pacientes (94%) atingiram, pelo menos, RHC, 63 (51%) pacientes alcançaram RCgC depois de um tempo mediano de 6 meses (variação: 3-18 meses) e 40 (32%) pacientes atingiram RMM depois de um tempo mediano de 6 meses (variação de 3-24 meses) [VISANI et al., 2010].

Cinqüenta e nove pacientes realizaram análise mutações no domínio cinase no momento da mudança do imatinibe para dasatinibe, e 24 (41%) pacientes apresentaram um tipo de mutação no domínio cinase. Curiosamente, os pacientes que apresentavam a mutação T315I ou F317L não tiveram um desempenho significativamente pior do que os pacientes com outras mutações. Os dados confirmaram que o dasatinibe é bem tolerado e eficaz em superar a resistência e intolerância ao imatinibe. Este trabalho é um dos poucos na literatura que relata o resultado do uso de ITC em pacientes com LMC fora do contexto de um estudo clínico [VISANI et al., 2010].

No Brasil, *Zalcberg e colaboradores* monitoraram 661 pacientes de LMC tratados com imatinibe como terapia de segunda linha, após o tratamento com Interferon, pois no Brasil, o imatinibe só foi autorizado como primeira linha a partir de 2008. Esse fato faz com esta coorte seja diferente das utilizadas em ensaios clínicos, reforçando o estudo de *Visani e colaboradores*, que evidencia as diferenças observadas em acompanhamento realizado na “vida real” em comparação ao realizado no contexto de estudos clínicos. Assim, foi identificado um grupo de pacientes respondedores tardios em comparação com as recomendações do GELN. Esse grupo representa 40% dos pacientes que não alcançaram a Resposta Ótima e para análise de mutação foram selecionados 125 pacientes. Mutações pontuais, envolvendo 17 diferentes aminoácidos foram detectadas em 25 pacientes. Três pacientes apresentaram dupla mutação [ZALCBERG et al., 2011].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar mutações no domínio cinase BCR-ABL em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica tratados com inibidores de tirosina cinase de primeira e segunda geração de um Estado da Região Sudeste do Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um banco de dados clínicos para caracterizar amostras de pacientes com LMC pertencente ao biobanco do Instituto Nacional de Câncer.
- Avaliar o status mutacional do BCR-ABL em pacientes de fenótipo resistente.
- Identificar tipos de mutação no domínio cinase BCR-ABL e estabelecer seu papel prognóstico.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento do banco de dados

O banco de dados foi desenvolvido em três etapas relacionadas a seguir: (1) escolha do programa para criação do modelo de banco de dados; (2) seleção dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes; e (3) construção do modelo de banco de dados para a centralização das informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC.

O banco de dados foi desenvolvido no aplicativo Microsoft Access®, presente no Microsoft Office® devido à facilidade de aquisição, manutenção, baixo custo e por permitir a importação e exportação de arquivos em outros formatos como exemplo, o Microsoft Excel®.

Os dados clínicos dos pacientes com LMC, os parâmetros moleculares e citogenéticos fundamentais para o diagnóstico e monitoramento da LMC foram selecionados e são evidenciados na tabela 3.1a.

Tabela 3.1a: Informações selecionadas para construção do banco de dados

Dados Clínicos	Parâmetros Laboratoriais
Data de nascimento	Hemograma
Data de diagnóstico	Mielograma
Índice Sokal	Citogenética
Tratamento	RT-PCR
Resposta ao tratamento	RQ-PCR
Tempo de tratamento	Análise de Mutação

RT-PCR: PCR de transcrição reversa, RQ-PCR: PCR quantitativo em tempo real, Índice Sokal: cálculo do risco relativo [Sokal et al., 1984].

A construção do modelo de banco de dados no Microsoft Access® envolveu a criação de seis planilhas que têm informações sistematizadas a serem coletadas e armazenadas. Cada planilha foi nomeada como segue: cadastro LMC, biologia molecular, citogenética, instituição, prescritor, dados clínicos. As informações correspondentes a cada planilha estão descritas na tabela 3.1b.

Tabela 3.1b: Informações das planilhas criadas para o banco de dados

	Informações
Cadastro	Nome do Paciente, ID, Prescritor, Nº do CRM-UF, Instituição, Nº de matrícula/prontuário.
Biologia Molecular	Data, Nº da amostra, Resultado do RT-PCR, Resultado do RQ-PCR, Tipo de RM, Análise de mutação.
Citogenética	Data, Cariótipo, % de cromossomo Ph, Tipo de RCg, Presença de alterações cromossômicas adicionais.
Instituição	Nome, Endereço, Telefone, Contato, e-mail.
Prescritor	Nome, Nº do CRM-UF, Instituição, Telefone, e-mail.
Dados Clínicos	Data de nascimento, Idade, Data do diagnóstico, Tempo de diagnóstico, Tamanho do Baço, Índice Sokal, Resultado do hemograma, Resultado do mielograma, Tratamento, Dose do medicamento, Aumento da dose do medicamento, Suspenção do tratamento, Mudança de tratamento.

ID: código de identificação do paciente, CRM: Conselho Regional de Medicina, UF: Unidade Federativa, RT-PCR: PCR de transcrição reversa, RQ-PCR: PCR quantitativo em tempo real, RM: resposta molecular, Ph: cromossomo *Philadelphia*, RCg: Resposta Citogenética.

3.2 Seleção do grupo de estudo

Foram incluídos os pacientes com LMC encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para avaliação da resposta molecular aos ITCs, provenientes de dois hospitais da Região da Grande Vitória que realizam atendimento aos pacientes portadores de LMC pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os pacientes estudados foram aqueles encaminhados entre os anos 2003-2012 de acordo com a disponibilidade de informação clínica, através de uma busca ativa nos prontuários médicos, e que atendem aos seguintes parâmetros: (i) pacientes com perda de qualquer tipo de resposta anterior (RH, RCg ou RM); (ii) pacientes com cinética crescente de transcritos *bcr-abl*; (iii) pacientes que não alcançaram RHC em até 3 meses; (iv) pacientes que não alcançaram uma RCgC em até 12 meses; (v) pacientes que não alcançaram uma RMM em até 18 meses; e (vi) mediante solicitação médica.

O estudo obedeceu às diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Res. nº 196/1996) de acordo com o projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o protocolo de pesquisa nº 285/11.

3.3 Processamento das amostras e extração de RNA

Amostras de 20mL de sangue periférico em ácido etileno di-amino tetra acético (EDTA) de cada paciente foram tratadas com tampão de lise de eritrócitos (RCLB), seguida por lavagem com tampão salino de fosfato (PBS), para obtenção da fração de leucócitos. Em seguida, uma alíquota de 5×10^{6} células foi ressuspensa em 1 mL de Trizol® [FORONI et al, 2011].

Para a extração de RNA (*ribonucleic acid*), foi adicionado a células em Trizol® clorofórmio seguido de centrifugação para separação da fase aquosa e orgânica. O RNA se mantem na fase aquosa, sendo recuperado pela precipitação com isopropanol, ressuspendido com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 65ºC. O controle positivo utilizado foi a linhagem celular K562 e para controle negativo a linhagem HL60. Como controle da reação foi utilizado água de injeção [OTAZÚ et al, 1999; FORONI et al, 2011].

Através da espectrofotometria verificou-se a concentração e a pureza do RNA extraído. A pureza do RNA extraído foi considerada adequada quando a razão da absorbância no comprimento de onda de 260/280 nm foi aproximadamente 2. A integridade do RNA extraído foi avaliada em função do tamanho de bandas obtidas pela eletroforese em gel de agarose 1,2 % em tampão fosfato seguido de coloração

com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e avaliação sob luz ultravioleta. O RNA extraído foi armazenado a -80ºC [OTAZÚ et al, 1999; OTAZÚ et al, 2000].

3.4 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 2 µg de RNA, adicionando um mistura contento deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), ditiotretol (DTT), *primers* randomicos hexaméricos (Random Hexamer Primers, Invitrogen®), tampão (Tris-HCl, 50mM KCl), enzima transcriptase reversa (SuperscriptTM, Invitrogen®) e o inibidor de RNAse *(ribonuclease)* (RNAguard, Invitrogen®) e água tratada com DEPC, sendo mantido a temperatura ambiente por 10 min seguido pela incubação a 42ºC por 40min. A reação de transcrição reversa foi finalizada pela incubação a 65ºC por 5min e o cDNA foi armazenado a -20ºC [OTAZÚ et al, 1999; OTAZÚ et al, 2000].

3.5 Avaliação da qualidade da amostra para estudo de mutação

A avaliação da qualidade do cDNA obtido foi realizada através da amplificação do gene constitutivo *bcr* em conjunto com o gene *bcr-abl* (PCR Multiplex). A primeira amplificação com *primers* (*short DNA fragment*) complementares as regiões dos

exons 13 e 14 do gene *bcr* e do exon 1 do gene *abl* para detecção das diferentes isoformas da região M-*bcr* b3a2 e b2a2. Além disso, *primers* complementares ao gene *bcr* foram utilizados na mesma reação para avaliar a amplificabilidade da amostra em função da amplificação do gene constitutivo *bcr* sendo, portanto, um controle do procedimento de extração de RNA e de transcrição reversa [OTAZÚ et al, 1999; OTAZÚ et al, 2000].

3.6 RT PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL

As reações de PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL foram realizadas em um volume final de 50 µL. O PCR foi do tipo semi-nested, em 2 etapas. A primeira etapa para amplificação do gene *bcr-abl* e uma segunda etapa utilizando *primers* mais internos para a amplificação do domínio cinase BCR-ABL. Este PCR foi realizado em duas etapas para excluir-se a possibilidade de amplificação e análise do gene *abl* normal presente no cromossomo 9 não envolvido na t(9;22). O protocolo de amplificação foi realizado como relacionado na tabela 3.6a e 3.6b [BRANDFORD, RUDZKI & HUGHES, 2000; BRANDFORD et al, 2002].

Tabela 3.6a: Reação de RT-PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL

	PCR- semi nested
Primeira etapa (50 µl)	Tampão PCR (20 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) $MgCl_2$: 1.5 mM dNTP: 200 µM *Primer:* *bcr*- cinase S 10pM *abl*- cinase KAS 10pM 2-3 µl de cDNA Taq Platinum ®: 1 U Água de injeção para completar o volume da reação
Segunda etapa (50 µl)	Tampão PCR (20 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) $MgCl_2$: 1.5 mM dNTP: 200 µM *Primer*: ABL- cinase S 10pM ABL- cinase KAS 10pM 1µl de produto da 1ª etapa Taq Platinum ®: 1 U Água de injeção para completar o volume da reação

Tabela 3.6 b: Condição experimental da amplificação do domínio cinase BCR-ABL

Primer	**Sequencia**	**Protocolo**	**Tamanho do Fragmento (bp)**
bcr-cinase S	tga cca act cgt gtg tga aac tc	93º C (5 min) 94º C (30s)	1ªetapa b2a2 = 1504
abl- cinase KAS	tcc act tcg tct gag ata ctg gat t	58º C (30 s) 72º C (1min e 30s)	b3a2 = 1579
abl-cinase S	cgc aac aag ccc act gtc t		2º etapa b2a2/b3a2 = 863

Fonte:BRANDFORD, RUDZKI & HUGHES, 2000; BRANDFORD et al, 2002.

Após a reação de PCR os produtos gerados foram avaliados em géis de agarose 2% corados com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (figura 3.6).

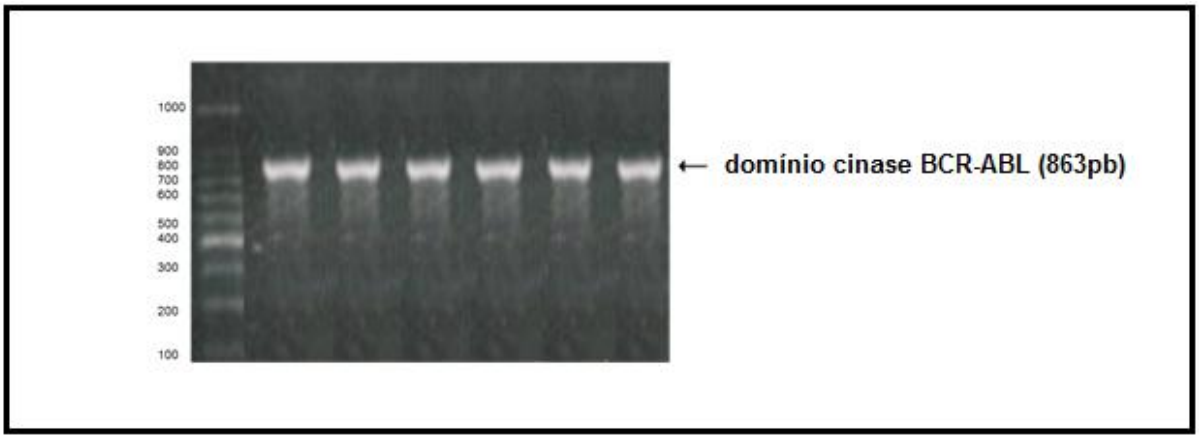

Figura 3.6: Produto da 2ª fase do RT- PCR para amplificação da região do domínio cinase BCR-ABL

3.7 Purificação, sequênciamento e análise de sequências

Os produtos de 863 pb gerados na segunda etapa da reação contendo o domínio cinase BCR-ABL foi purificado com o sistema de colunas *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*® (*Amersham biotech*®), segundo as recomendações do fabricante. Após a purificação, o produto foi avaliado em gel de agarose 2% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para avaliação do procedimento de purificação.

Para o sequenciamento direto dos produtos, utilizou-se o kit comercial *DYEnamic ET*® (*Amersham biotech*®) segundo as recomendações do fabricante. Dessa forma, as reações foram preparadas em placa, adicionando 4 µl do produto purificado, 2 µl do *primer abl*- cinase ou *abl*- cinase KR e 4µl da mistura comercial DYEnamic ET®, depois a placa foi submetida a uma reação de sequenciamento por 50 ciclos com o perfil térmico de 95°C (20 s), 50°C (15 s) e 60°C (1 min), com uma etapa final a 4° C.

A precipitação da placa de sequenciamento foi realizada adicionando 27,5 µl de álcool absoluto, incubado por 20min no gelo, seguido de uma centrifugação a 4000 rpm, 4ºC por 30min. Na sequência foi lavado com 150µl de álcool 70% e centrifugado novamente por 10 min. Após a retirada completa do etanol, os produtos foram ressuspendidos em tampão de corrida (EDTA 1mM pH 8.0/formamida 70%) e colocados em um sequenciador capilar automático para leitura das sequências.

A análise do eletroferograma das sequências do domínio cinase BCR-ABL obtida, foi realizada através da comparação com a sequência do gene *abl* disponível no *GenBank* (número de acesso M14752) utilizando-se o programa *Mutation Surveyor*® (Softgenetics®).

3.8 Análise estatística

A comparação entre as variáveis categóricas foi realizada através do teste exato de Fisher. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney. A análise de sobrevida global (SG) foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e comparadas com o teste de Wilcoxon. O limite de significância para todas as análises foi definida como $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o programa Epi Info® versão 3.5.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Banco de dados

O banco de dados de LMC desenvolvido no Microsoft Access® foi implantado no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA. Foram cadastradas 6.599 amostras recebidas pelo Laboratório de Biologia Molecular, desde 1997, para diagnóstico e/ou acompanhamento, correspondendo hoje ao monitoramento de 855 pacientes com LMC do INCA e de 26 instituições parceiras, através da detecção dos níveis de *bcr-abl* por RQ-PCR.

A partir das seis planilhas desenvolvidas (cadastro, biologia molecular, citogenética, instituição, prescritor e dados clínicos) criaram-se relações entre as mesmas, permitindo o cruzamento das informações (figura 4.1a), além da criação de um formulário padrão, específico para este estudo, para preenchimento dos dados do paciente (figura 4.1b). Desta maneira, uma busca rápida dos pacientes com RMM, ou dos pacientes acompanhados mensalmente, por exemplo, pode ser feita a partir da geração de relatórios sobre o número de pacientes acompanhados por mês, número de pacientes com RCgC ou RMM, além de permitir a construção de laudos dos resultados de biologia molecular e a criação de gráficos para acompanhamento da cinética dos transcritos de *bcr-abl*.

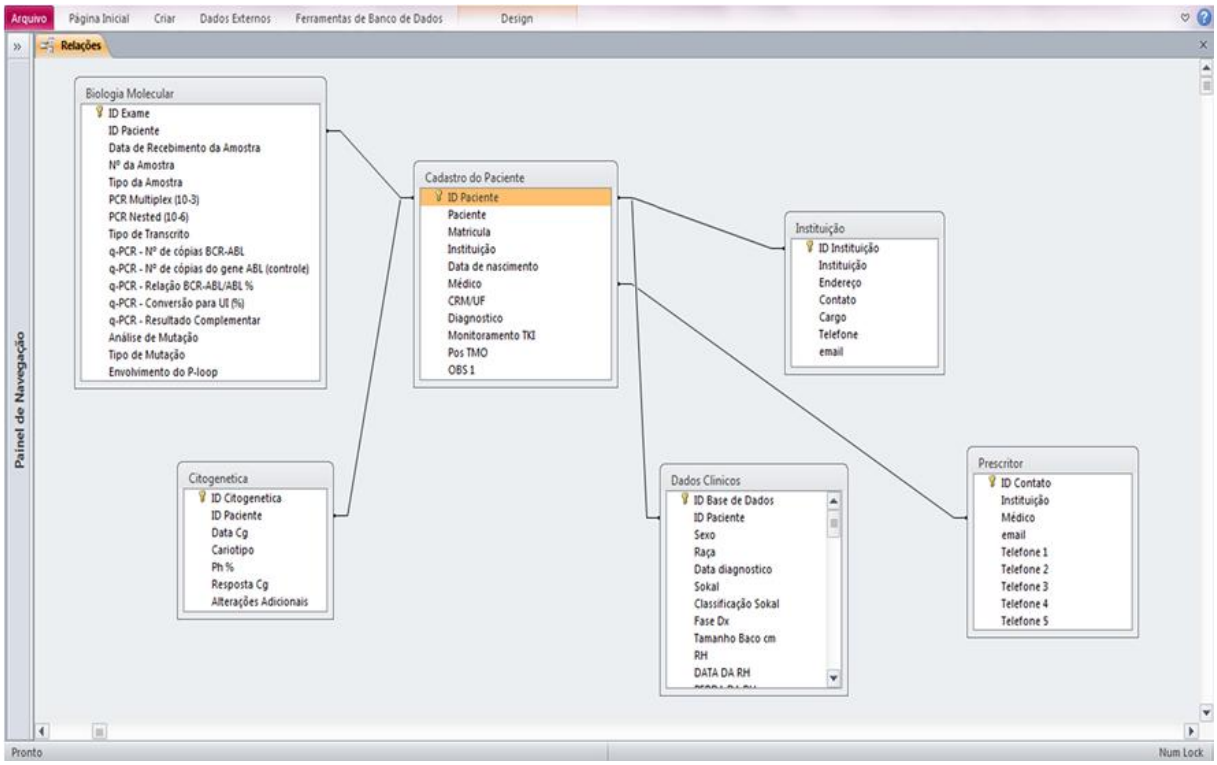

Figura 4.1a:Visualização geral da interação entre os dados. Relações entre as planilhas criadas no Microsoft Access® para cruzamento das informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC.

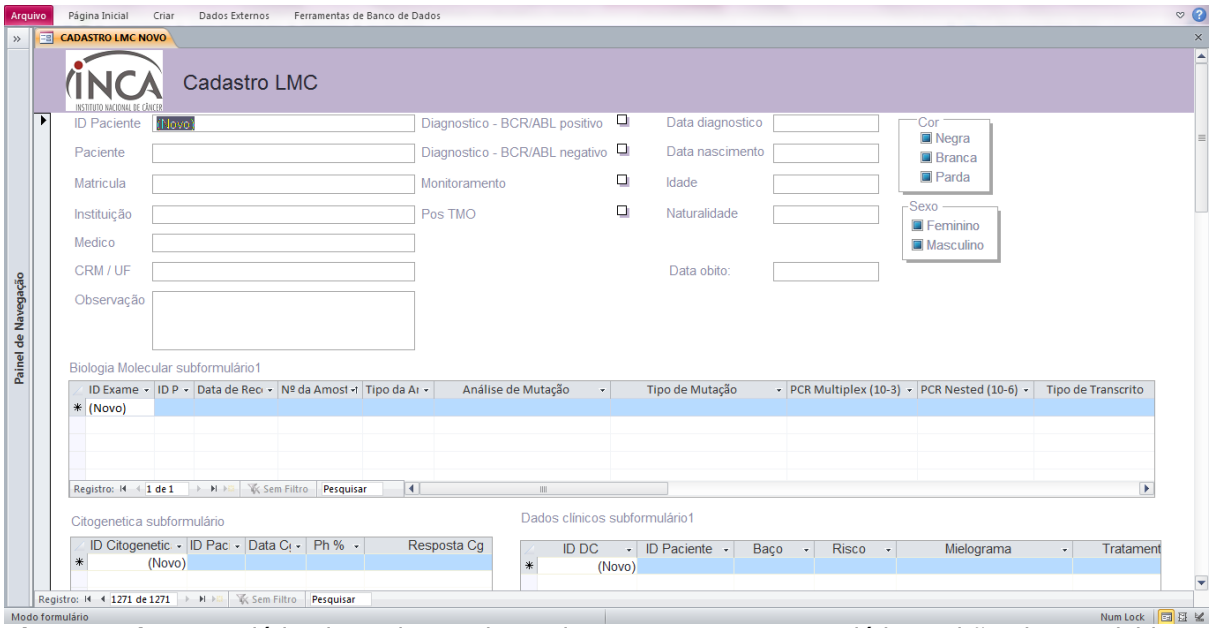

Figura 4.1b: Formulário de cadastro de paciente com LMC. Formulário padrão desenvolvido no Microsoft Access® para coleta das informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC.

Cada paciente é identificado por um número exclusivo, evitando duplicidade e preservando a confidencialidade. Até o momento, através do banco de dados pode-se identificar que 457 amostras de pacientes com LMC foram avaliadas para

mutação pelo Laboratório de Biologia Molecular, por atenderem os critérios para análise de mutação como preconizado por Soverini e colaboradores ou por solicitação médica. Destas análises identificou-se a presença de mutação em 105 amostras, correspondendo a 37 pacientes.

Durante o ano de 2012, o Laboratório de Biologia Molecular analisou 132 amostras para mutação e foram identificados 10 tipos de mutações (T315I, D276G, A397P, M244V, E279K, F391I, F317L, G250E, E255K e Y253F). A mutação T315I foi identificada em 8 pacientes, sendo que um paciente apresentava a mutação A397P em associação a T315I. As mutações G250E e E255K foram identificadas em associação em um paciente e outros 5 pacientes apresentaram apenas uma destas mutações.

O desenvolvimento de banco de dados é importante porque facilita o acompanhamento de pacientes com LMC o que favorece o monitoramento desses pacientes e a compreensão da evolução da doença, do tratamento além de antecipar uma possível falha terapêutica e/ou recaída. Todas as variantes que envolvem o paciente, tais como características individuais do paciente, condição clínica, co-morbidades, adesão ao tratamento e resultados laboratoriais podem ser analisados em conjunto em um só lugar. Isto permite ganhar tempo para intervir em situações de recaída.

O sistema de prontuário impõe desafios significativos para a pesquisa. Muitas vezes o prontuário pode não ser facilmente localizado e as informações nem sempre estão legíveis, o que dificulta a compreensão adequada. Com o prontuário eletrônico as dificuldades são outras, visto que é altamente segmentado por área e o acesso é restrito ao profissional de cada área. Assim, as informações armazenadas no banco de dados do Microsoft Access® podem servir de apoio para o desenvolvimento de pesquisa translacional ao concentrar toda a informação envolvendo o monitoramento de pacientes com LMC num só lugar e com a possibilidade de exportar os dados para outros formatos como o Adobe Reader® e Microsoft Excel®. Isso facilita a troca de informações entre o clínico e o laboratório proporcionando, confiabilidade, agilidade, cooperação e acima de tudo favorecendo o resultado final que é o tratamento dado ao paciente.

4.2 Características clínicas do grupo estudado

Os dois hospitais participantes do estudo encaminharam 83 pacientes com LMC para o Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA para avaliação da resposta molecular aos ITCs. Nesse grupo, 23 (27,7%) pacientes apresentaram os parâmetros para a análise de mutação. Características gerais dos 23 pacientes estudados estão descritas na tabela 4.2a.

O grupo apresentou uma mediana de idade de 42 anos (23-71) e uma mediana de tempo de diagnóstico de 47 meses (17-204). O índice Sokal em 11 pacientes era de baixo risco, em 2 pacientes era risco intermediário, em 2 pacientes era alto risco e em 8 pacientes não foi encontrado a informação. Todo o grupo utilizou o imatinibe como primeiro ITC e ao iniciar o tratamento 22 pacientes estavam em FC e 1 paciente em FA. A paciente ID16 foi diagnosticada com LMC na infância. Os pacientes ID46 e ID53 foram transferidos para o centro participante do estudo após 1 ano e 5 anos, respectivamente, do diagnóstico, em uso de Hidroxiuréia.

Durante o tratamento com imatinibe cinco pacientes (ID9, ID14, ID21, ID67, ID69) tiveram o aumento da dose de 400mg para 600mg e 1 paciente (ID16) para 800mg. Apenas 1 paciente (ID9) permanece com o imatinibe e os demais pacientes suspenderam o imatinibe, 3 (14%) pacientes por resposta subótima e 19 (86%) pacientes por falha terapêutica (tabela 4.2b) segundo os critérios de *Baccarani e colaboradores* (2009). A mediana de tempo de tratamento com imatinibe foi de 20 meses (7-60). O paciente ID21 é alcoólico e apresentou toxicidade hematológica frequentemente, ocasionando redução da dose de imatinibe. O paciente ID65 não apresentava adesão ao tratamento.

Após a suspensão do imatinibe, 15(68%) pacientes iniciaram tratamento com dasatinibe e 7(32%) pacientes com nilotinibe como segundo ITC. A mediana de tempo de tratamento com dasatinibe foi de 14 meses (4-52) e com nilotinibe foi de 8,5 meses (5-25). Em 6(27%) pacientes o tratamento com o segundo ITC foi

suspenso, sendo 3 pacientes em uso de dasatinibe e 3 com nilotinibe devido a falha terapêutica. Os pacientes que suspenderam o dasatinibe iniciaram tratamento com nilotinibe e os pacientes que suspenderam o nilotinibe iniciaram tratamento com dasatinibe. Dessa forma, 6 pacientes fizeram uso de três ITC.

Cinco pacientes (ID12, ID14, ID18, ID34, ID65) foram encaminhados para o transplante de medula óssea (TMO) após terapia com ITC. Permaneceram em tratamento com dasatinibe 12 pacientes e com nilotinibe 5 pacientes. Apenas 1 paciente (ID69) do grupo estudado alcançou uma resposta ótima com o uso de um segundo ITC após falha terapêutica com imatinibe.

No momento da primeira análise de mutação a mediana de tempo a partir do diagnóstico foi de 26 meses (7-180), a mediana de idade foi de 42 anos (22-61). A análise de mutação foi realizada em 8 pacientes em dois momentos: durante o tratamento com imatinibe e dasatinibe(6), imatinibe e nilotinibe(1), e dasatinibe e nilotinibe(1). Em 15 pacientes a análise de mutação foi realizada somente durante o tratamento com imatinibe (4) ou dasatinibe (10) ou nilotinibe (1).

Mutações pontuais no domínio cinase BCR-ABL foram detectada em 5 pacientes (21,7%), das quais foram identificados 3 aminoácidos: T315I (n=3), F317L (n=1) e Y253F (n=1) (figura 4.3a, 4.3b e 4.3c). Não foi identificada mutação no paciente (ID72) que ao iniciar o tratamento com ITC estava em FA. As mutações identificadas fazem parte do grupo de mutações que influenciam na escolha do ITC subsequente.

A mutação T315I encontra-se no sítio de ligação do imatinibe e in vitro determina uma resistência completa ao imatinibe, nilotinibe e dasatinibe [O' HARE, EIDE & DEININGER, 2007; REDAELLI, et al., 2009]. Essa mutação foi identificada em três pacientes (ID14, ID47, ID53).

A mutação F317L apresenta in vitro resistência ao imatinibe e está localizada no sítio de ligação do imatinibe. Conforme O' Hare e colaboradores a mutação F317L in vitro apresenta resistência para o dasatinibe, sendo sensível ao nilotinibe. Para Redaelli e colaboradores a mutação F317L in vitro foi classificada como resistente para o dasatinibe e sensibilidade intermediária para o nilotinibe [O' HARE, EIDE & DEININGER, 2007; REDAELLI, et al., 2009].

A mutação Y253F encontra-se na região do P-loop e apresenta in vitro uma resistência ao imatinibe. Essa mutação, in vitro, é sensível ao dasatinibe e apresenta sensibilidade intermediária para o nilotinibe [O' HARE, EIDE & DEININGER, 2007; REDAELLI, et al., 2009].

Tabela 4.2a: Características do grupo de estudo

ID	Idade (anos)	Fase	Sexo	Índice Sokal	Risco	Tempo de diagnostic (meses)	1º ITC	2º ITC	3º ITC	Encaminhado para TMO
5	41	FC	F	0,78	Baixo	47	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
9	62	FC	F	0,71	Baixo	91	Imatinibe	NU	NU	Não
12	51	FC	F	DND	DND	58	Imatinibe	Nilotinibe	Dasatinibe	Sim
14	32	FC	F	0,61	Baixo	118	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Sim
15	63	FC	M	0,75	Baixo	52	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
16	29	FC	F	DND	DND	204	Imatinibe	Dasatinibe	Nilotinibe	Não
18	33	FC	F	DND	DND	103	Imatinibe	Dasatinibe	Nilotinibe	Sim
21	62	FC	M	0,79	Baixo	114	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
23	23	FC	F	1,03	Intermediário	25	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
34	47	FC	F	DND	DND	46	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Sim
39	71	FC	F	0,98	Intermediário	27	Imatinibe	Dasatinibe	Nilotinibe	Não
46	41	FC	F	DND	DND	47	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
47	51	FC	F	DND	DND	47	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
51	34	FC	M	0,66	Baixo	56	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
53	52	FC	M	DND	DND	119	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
55	42	FC	M	DND	DND	17	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não
61	29	FC	M	1,31	Alto	42	Imatinibe	Nilotinibe	Dasatinibe	Não
62	38	FC	M	0,63	Baixo	16	Imatinibe	Nilotinibe	NU	Não
65	58	FC	M	0,7	Baixo	41	Imatinibe	Nilotinibe	Dasatinibe	Sim
67	60	FC	M	1,28	Alto	22	Imatinibe	Nilotinibe	NU	Não
68	41	FC	M	0,59	Baixo	20	Imatinibe	Nilotinibe	NU	Não
69	61	FC	M	0,73	Baixo	42	Imatinibe	Nilotinibe	NU	Não
72	36	FA	M	0,52	Baixo	26	Imatinibe	Dasatinibe	NU	Não

FC: fase crônica, FA: fase acelerada, F:femino, M:masculino, DND: dado não disponível, ITC: inibidor de tirosina cinase, NU: não utilizou, TMO; transplante de medula óssea.

Tabela 4.2b: Evolução do grupo de estudo durante o tratamento com ITC

	Imatinibe			Dasatinibe			Nilotinibe			
ID	**Tempo (meses)**	**Resposta**	**Parâmetro**	**Tempo (meses)**	**Resposta**	**Parâmetro**	**Tempo (meses)**	**Resposta**	**Parâmetro**	**Mutação**
5	14	FT	Menos que RCgP aos 12 meses	29	RS	RCgP aos 12 meses	---	---	---	Negativo
9	60	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	---	---	---	---	---	---	Negativo
12	14	FT	Menos que RCgP aos 12 meses	11	FT	RCgN aos 6 meses / Toxicidade	9	FT	RCgN aos 6 meses	Negativo
14	58	FT	Perda da RHC	11	FT	Toxicidade / Mutação	---	---	---	T315I
15	23	RS	Menos que RMM aos 18 meses	19	RS	Perda da RMM	---	---	---	Negativo
16	48	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	36	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	6	RS	Menos que RCgP aos 6 meses	Negativo
18	59	FT	Perda da RCgC	3	FT	Toxicidade	20	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	Negativo
21	42	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	52	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	---	---	---	Negativo
23	5	FT	Menos que RHC aos 3 meses	14	RS	RCgP aos 12 meses	---	---	---	Negativo
34	24	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	19	FT	Perda da RHC	---	---	---	Negativo
39	12	FT	RCgN aos 6 meses	4	FT	Toxicidade	9	FT	RCgN aos 6 meses	Negativo
46	27	RS	RCgP aos 12 meses	15	RS	Perda da RMM	---	---	---	Negativo
47	33	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	14	FT	Mutação	---	---	---	T315I
51	24	RS	Menos que RMM aos 18 meses	24	RS	Perda da RMM	---	---	---	Negativo
53	27	FT	Mutação	26	FT	Mutação	---	---	---	T315I
55	7	FT	Toxicidade	8	RS	RCgN aos 3 meses	---	---	---	Negativo
61	20	FT	Menos que RCgP aos 12 meses	9	RS	Menos que RCgP aos 6 meses	15	FT	Menos que RCgP aos 12 meses	Negativo
62	8	FT	RCgN aos 6 meses	---	---	---	8	*	*	Negativo
65	14	FT	Menos que RCgP aos 12 meses	4	FT	Mutação	13	FT	RCgN aos 6 meses	F317L
67	18	FT	Mutação	---	---	---	4	*	---	Y253F
68	11	FT	Toxicidade	---	---	---	8	*	*	Negativo
69	17	FT	Menos que RCgC aos 18 meses	---	---	---	25	RO	RMM aos 12 meses	Negativo
72	11	FT	Evolução clonal	13	*	*	---	---	---	Negativo

FT: falha terapêutica, RS: resposta Subótima, RO: resposta ótima, RCgC: resposta citogenética completa, RCgP: resposta citogenética parcial, RHC: resposta hematológica completa, RMM: resposta molecular maior.*sem exames laboratoriais para avaliação de resposta.

4.3 Descrição dos pacientes que apresentaram mutação no domínio cinase BCR-ABL

A paciente ID14 de 32 anos iniciou tratamento com imatinibe 400mg/dia, em FC e com índice Sokal de baixo risco. A dose foi aumentada para 600mg/dia após 50 meses de tratamento por apresentar 3% de blasto em sangue periférico. Depois de oito meses do aumento da dose o imatinibe foi suspenso por falta de controle hematológico e iniciou-se dasatinibe 100mg/dia. A análise de mutação foi realizada aos oito meses de tratamento com dasatinibe, identificando a mutação T315I. A paciente foi encaminhada para TMO. Durante todo o tratamento com dasatinibe a paciente apresentou 100% de cromossomo Ph na análise citogenética e osteonecrose de cabeça de fêmur.

A paciente ID47 de 51 anos, FC, realizou tratamento com imatinibe durante 33 meses, sendo que aos 24 meses apresentava ausência de RM. Após a suspensão do imatinibe foi iniciado tratamento com dasatinibe, inicialmente 70mg/dia e em seguida aumentou para 100mg/dia. Com dasatinibe a paciente alcançou RCgC após 12 meses, mas com a presença da trissomia do cromossomo 8. Aos sete meses de tratamento com dasatinibe a análise de mutação foi realizada, identificando a mutação T315I.

O paciente ID53 de 52 anos, permaneceu 5 anos em uso de Hidroxiuréia antes de ser encaminhado para o centro participante do estudo. Fez uso de imatinibe 400mg/dia e aos 15 meses de tratamento foi identificada a mutação T315I. O tratamento foi mantido por mais 12 meses e sendo depois substituído pelo dasatinibe 140mg/dia. O paciente ID53 fica oscilando entre RMMe e RMMi, e alcançou a RCgC com dasatinibe. Novas amostras de SP foram avaliadas para análise de mutação, todas confirmaram a presença da mutação T315I.

Os pacientes ID47 e ID53 continuam em tratamento com ITC, apesar da presença da mutação T315I porque não possuem doadores de medula óssea para realizarem do TMO.

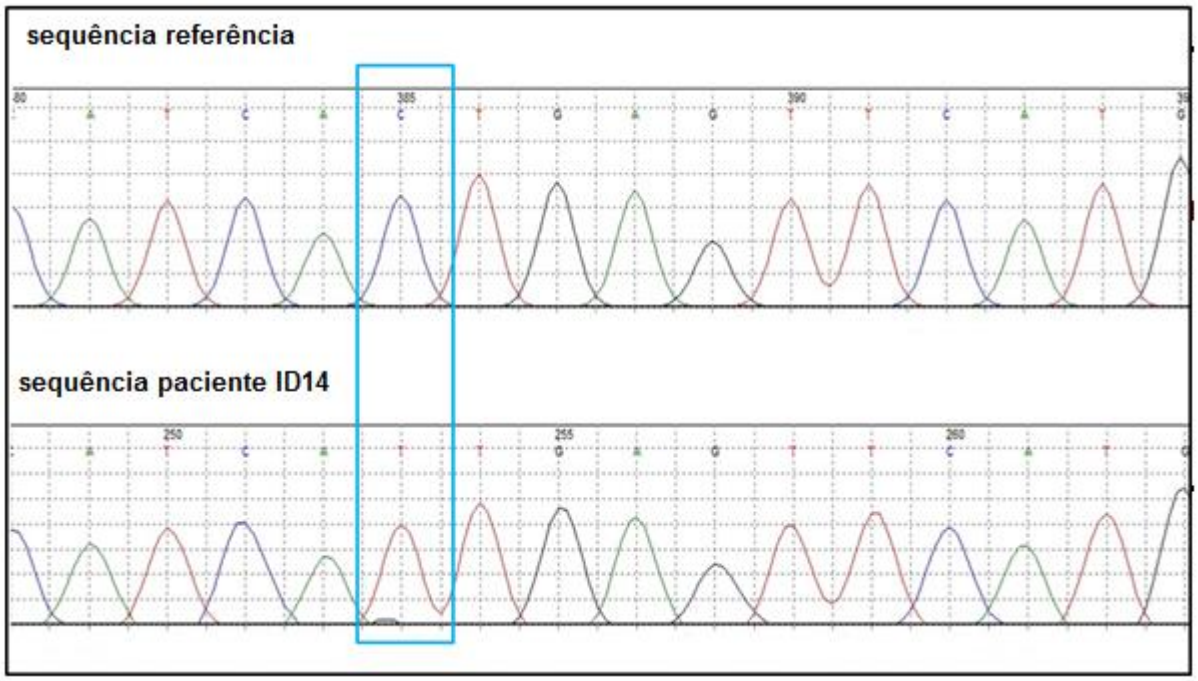

Figura 4.3a: Eletroferograma da mutação T315I. Sequência com uma timina (em vermelho) no lugar de uma citosina (em azul). Esta alteração de sequência determina a troca do aminoácido treonina (ACT) pela isoleucina (ATT).

O paciente ID65 portador da mutação F317L tem 58 anos e iniciou o uso de imatinibe em FC, com índice Sokal de baixo risco e dose de 400mg/dia. A citogenética ao diagnóstico demostrava alterações cromossômicas como a deleção do cromossomo 7 e duplicação do cromossomo 6. Aos doze meses de tratamento com imatinibe o paciente apresentou 100% de cromossomo Ph na análise citogenética, sendo considerado falha terapêutica. No mesmo período, a análise de mutação foi realizada e nenhuma mutação foi identificada. O imatinibe foi suspenso e iniciou-se o tratamento com nilotinibe 800mg/dia. Aos 3 meses de tratamento a análise citogenética apresentou 100% de cromossomo Ph, sem alterações adicionais. O nilotinibe foi mantido por mais dez meses, mas o paciente permaneceu sem RCg, sendo então suspenso o nilotinibe. Em seguida iniciou-se o tratamento com dasatinibe 100mg/dia e aos 3 meses de tratamento realizou-se a análise de mutação, identificando a mutação F317L. O paciente foi encaminhado para o TMO.

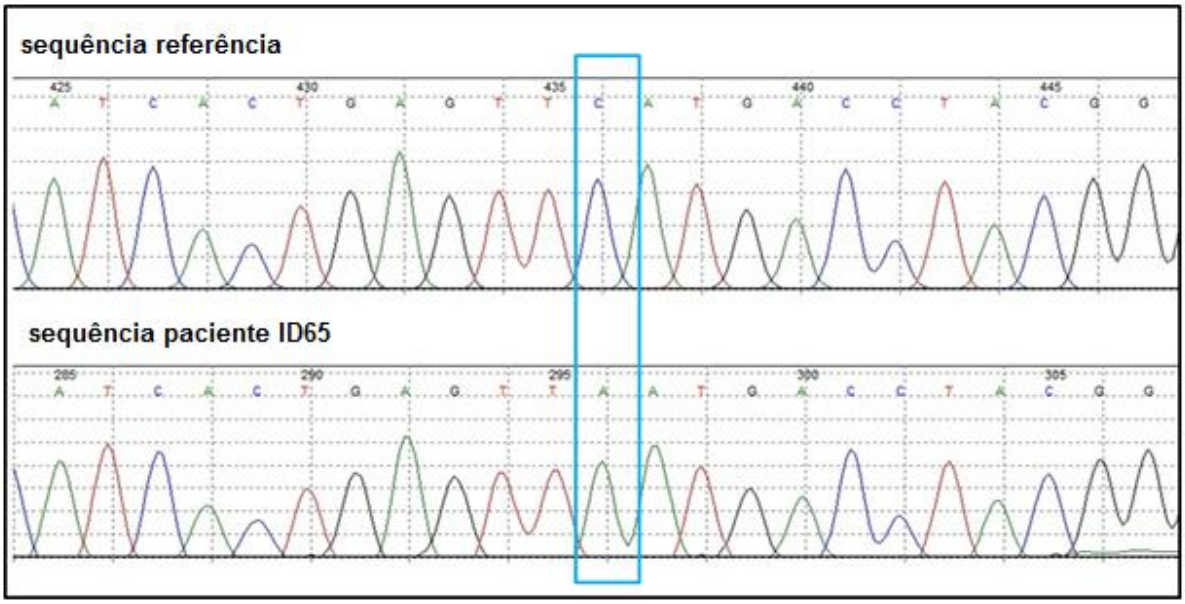

Figura 4.3b: Eletroferograma da mutação F317L. Sequência com uma adenina (em verde) no lugar de uma citosina (em azul). Esta alteração de sequência determina a troca do aminoácido fenilalanina (TTC) pela leucina (TTA).

A mutação Y253F foi identificada no paciente ID67 com 60 anos, que iniciou o tratamento de imatinibe com 400mg/dia em FC, com índice Sokal de alto risco e esplenomegalia. O paciente alcançou RHC aos 3 meses e aos 8 meses de tratamento houve aumento da dose para 600mg/dia por não apresentar diminuição nos níveis de bcr-abl. A análise citogenética não foi possível devido à ausência de mitose. Aos 18 meses de tratamento com imatinibe o paciente não alcançou a RMM e a análise de mutação foi realizada, identificando a mutação Y253F. O tratamento com imatinibe foi suspenso e iniciou-se o nilotinibe 400mg/dia.

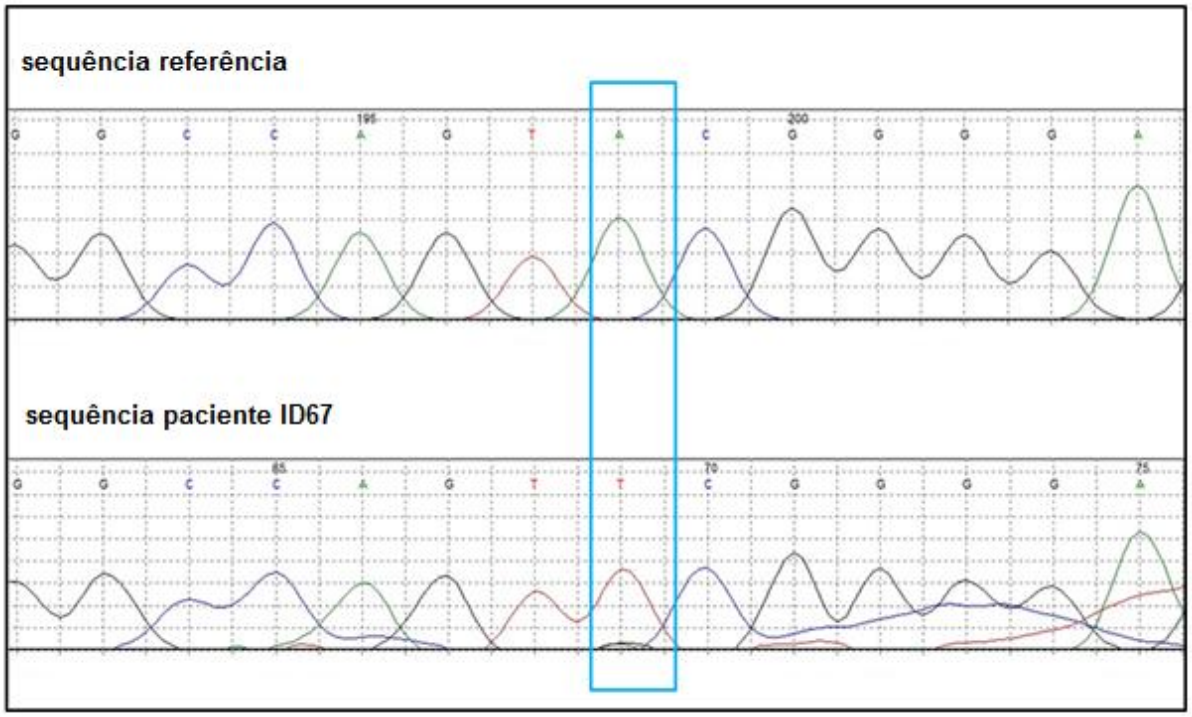

Figura 4.3c: Eletroferograma da mutação Y253F. Sequência com uma timina (em vermelho) no lugar de uma adenina (em verde). Esta alteração de sequência determina a troca do aminoácido tirosina (TAC) pela fenilalanina (TTC).

A determinação da sensibilidade *in vitro* das mutações aos ITC é importante, apesar de existir divergências entres os estudos que determinam e classificam essa sensibilidade. A análise de mutação possibilita correlacionar à mutação identificada com a sensibilidade da mesma frente aos diferentes ITC. Esses resultados contribuem para a tomada de decisão na escolha entre o subsequente ITC ou para encaminhar o paciente para o TMO. Diante de uma mutação em que estudos demonstram à incapacidade de resposta à terapia com ITC, a busca de doador de MO pode ser estabelecido de forma precoce, visto que existe um limite de idade para realizar o TMO.

No grupo estudado não houve relação entre a presença de mutação e a fase da doença ao diagnóstico (p=0,78) ou ter feito uso de um ou dois ITCs após a suspensão do imatinibe (p=0,58). Em relação ao tempo de uso de imatinibe com a presença de mutação, também não foi significativo, considerando quem fez uso até 18 meses (p=0,45), até 24 meses (p=0,39) e acima de 24 meses (0,39). Considerando a mediana de tempo total de tratamento com os ITCs não houve diferença entre os pacientes que apresentaram mutação e os pacientes sem

mutação (p=0,6). A sobrevida global foi calculada considerando a data de início do tratamento com imatinibe e a data do último contato ou a data da suspensão do último ITC em uso, não apresentando diferença entre os pacientes com ou sem mutação (p=0,25) (Figura 4.3d). Devido ao número de participantes do estudo ser reduzido, a análise estatística é prejudicada, porém, este é o primeiro trabalho com participantes do Espírito Santo, necessitando futuramente de outros estudos com um maior número de participantes para poder expressar a casuística do Estado.

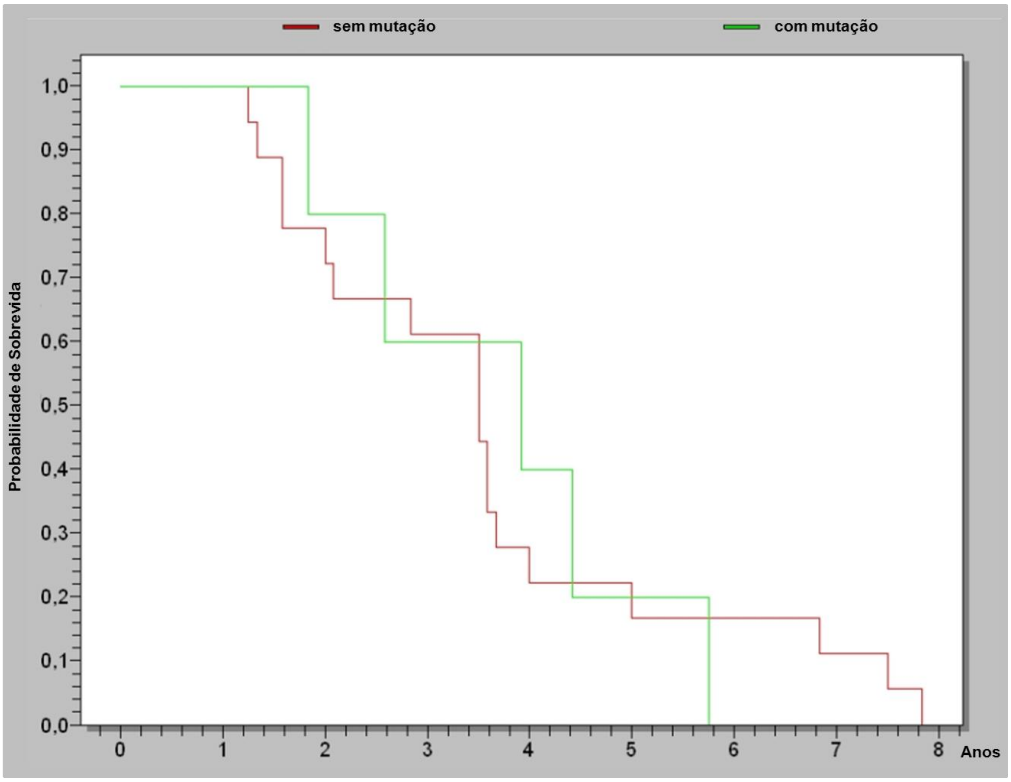

Figura 4.3d:Sobrevida global do grupo estudado

A resposta ao tratamento com ITC *in vivo* pode se apresentar de forma diferente do que os estudos *in vitro* demonstram; como é o caso do paciente que apresenta a mutação F317L, que não respondeu ao tratamento com nilotinibe como seria esperado de acordo com *O' Hare e colaboradores*. A partir da criação banco de dados que uniformize os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LMC de forma confiável e robusta será possível caracterizar melhor o fenótipo resistente.

5 CONCLUSÃO

O estudo introduziu a grande Vitória dentro do contexto do INCA e de um Laboratório de Biologia Molecular de referência em LMC. Entre os pacientes com LMC que apresentavam um fenótipo de resistência, a presença de mutação no domínio cinase BCR-ABL foi identificada em cinco (21,7%) pacientes, correspondendo a três tipos de mutação: T315I, F317L e Y253F que influenciam na escolha do ITC subsequente.

A criação do banco de dados auxiliou na seleção do grupo de estudo e permitiu maior agilidade para transferência de dados para o programa estatístico. Além disso, tem possibilitado gerar relatórios mensais da relação de pacientes com LMC monitorados e a avaliação de outros parâmetros de resposta.

A coleta de dados dos pacientes com LMC no Estado vai continuar para poder esboçar um relato dos pacientes que apresentam uma resposta ótima ao tratamento com ITC e para comparar com os pacientes que apresentam um fenótipo resistente. A análise estatística está sendo aplicada ao grupo total cadastrado no banco de dados e vários trabalhos satélites foram originados a partir do banco de dados desenvolvido, como marcadores preditivos de resistência, identificação de fenótipo resistente com ausência de mutação, desenvolvimento de um banco de dados para doenças mieloproliferativas *bcr-abl* negativas e leucemias agudas.

6 REFERÊNCIAS

ALIKIAN, M., et al. BCR-ABL1 kinase domain mutations: Methodology and clinical evaluation. **American Journal of Hematology**, v.87, p.298-304, 2012.

APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncology**, v.8, n. 11, p. 1018-29, 2007.

BACCARANI, M., et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 6041- 6051, 2009.

BACCARANI, M., et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 108, n. 6, p.1809-1820, 2006.

BARTRAM, C. R. et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 277-280, 1983.

BRANDFORD, S., MELO, J.V., HUGHES, T.P. Selecting optimal second line tyrosine kinase therapy for chronic myeloid leukemia patients afther imatinibe failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? **Blood**, v.114, n. 27, p. 5426-34, 2009.

BRANDFORD, S., RUDZKI Z., HUGHES, T.P. A novel BCR±ABL transcript (e8a2) with the insertion of an inverted sequence of ABL intron 1b in a patient with Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v.109, p. 635-637, 2000.

BRANDFORD, S., et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate–binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. **Blood**, v. 99, n. 9, p. 3472-3475, 2002.

CROSS, N.C.P., et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v.104, p. 1-4, 2012.

DEININGER M., et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. **ASH Annual Meeting Abstracts.** 2009;114:1126.

DEININGER, M. W. N., GOLDMAN, J. M., MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DRUKER, B. J., LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 1, p.3-7, 2000.

EIRING, A. M., et al. Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. **BMC Medicine**, v.9, n. 99, p.1-6, 2011.

ERNST, T., et al. BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America Survey**, v. 25, p.997-1008, 2011.

ERNST, T., et al. A co-operative evaluation of different methods of detecting BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia on second-line dasatinib or nilotinib therapy after failure of imatinib. **Haematologica**, v.94, p1227–35, 2009.

FADERL, S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.

FORONI, L., et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 trnascripts in chronic myeloid leukaemia. **British journal of Hematology**, v.153, p. 179-190, 2011.

GOLEMOVIC, M., et al. AMN107, a Novel Aminopyrimidine Inhibitor of Bcr-Abl, Has In vitro Activity against Imatinib-Resistant ChronicMyeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 13, p. 4941-47, 2005.

GROFFEN, J. et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **Cell**, v. 36, p.93-99, 1984.

HARRINGTON, E. A. et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. **Nature**, v.10, n.3, p.262-267, 2004.

HOCHHAUS, A., et al. Six-year follow- up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v.23, n.6, p. 1054-61, 2009.

HOCHHAUS, A., et al. Favorable long term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinibe mesylate therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia afther failure of interferon-α treatment. **Blood**, v.111, n.3, p.1039-1043, 2008.

HOCHHAUS, A., LA ROSÉE, P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. **Leukemia**, v. 18, p. 1321-1331, 2004.

HOCHHAUS, A., et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, v. 16, p. 2190-96, 2002.

JABBOUR, E., et al. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. **Blood**, v. 114, n. 10, p. 2037-2043, 2009.

KANTARJIAN, H.; CORTES, J. Considerations in the Management of Patients With Philadelphia Chromosome–Positive Chronic Myeloid Leukemia Receiving Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 12, p. 1512-1516, 2011.

LOMBARDO, L. et al. Discovery of N-(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(20hydroxyethyl)- piperazin-1-yl)-2-methylprimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p. 6658-6661, 2004.

MCFARLAND, K. L., WETZSTEIN, G. A. Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Focus on Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors. **Cancer Control**, v. 16, n. 2, p. 132-140, 2009.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion protein and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**, v.88, p. 2375-2384, 1996.

MILOJKOVIC, D., APPERLEY, J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and second-generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 24, p.7519-7527, 2009.

NAGAR, B. c-Abl Tyrosine Kinase and Inhibition by the Cancer Drug Imatinib (Gleevec/STI-571). **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1518S–1523S, 2007.

NOWELL, P.; HUNGERFORD, D. A. Minute chromossome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497, 1960.

O'HARE, T., et al. In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. **Cancer Research**, v.65, n. 11, p. 4500-4505, 2005.

O'HARE, T., EIDE, C.A., DEININGER, M. W. N. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2242-49, 2007.

O'HARE, T., et al. AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. **Cancer Cell**, v.16, n. 3, p.401–412, 2009.

O'HARE, et al., 2012. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. **Nature**, v.12, p.513-526.

OTAZÚ, I. B., et al. Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disordes. **Leukemia and Lymphoma,** v.37, p. 205-211, 2000.

OTAZÚ, I. B., et al. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia by nested PCR. **Leukemia Research**, v.23, p. 185-190, 1999.

REDAELLI, S., et al. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. **Journal Clinical Oncology**, v. 27, n. 3, p.469-71, 2009.

REN, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nature**, v. 5, n. 3, p. 172-183, 2005.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromossomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290-293, 1973.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SCHINDLER, T., et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. **Science**, v.289, p.1938-1942, 2000.

SCHITTENHELM, M. M., et al .Dasatinib (BMS-354825), a Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor, Inhibits the Kinase Activity of Wild-Type, Juxtamembrane, and Activation Loop Mutant KIT Isoforms Associated with Human Malignancies. **Cancer Research**, v. 66, n.1, p. 473-481, 2006.

SHAH, N. P. Front-Line TKI Therapy for Chronic-Phase CML: the Luxury of Choice. **Oncology**, v.26, n. 10, 2012.

Sokal, J. E., et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v. 63, p. 789-799, 1984.

SOVERINI S., et al. Choosing the best second-line tyrosine kinase inhibitor in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients harboring Bcr-Abl kinase domain mutations: how reliable is the IC_{50}? **The Oncologist**, v.16, n. 6, p. 868-76, 2011.

SOVERINI S., et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. **Blood**, v.118, n.5, p. 1208-1215.

STEELMAN, L. S. et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, v. 18, p. 189–218, 2004.

THIJSEN, S. et al. Chronic myeloid leucemia from basics to bedside. **Leukemia**, v. 13, p. 1646-1674, 1999.

VISANI, G. et al. Dasatinib, even at low doses, is an effective second-line therapy for chronic myeloid leukemia patients resistant or intolerant to imatinib. Results from a real life-based Italian multicenter retrospective study on 114 patients. **American Journal of Hematology**, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.21871/full. Acesso em: 17 de julho de 2012.

ZALCBERG, I., et al. The significance of major and stable molecular responses in chronic myeloid leukemia in the tyrosine kinase inhibitor era. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.33, n. 6, p. 455-60, 2011.

WEISBERG, E., et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. **Cancer Cell**, v. 7, p. 129-141, 2005.

7 ANEXO:

7.1 Trabalho Apresentado no I Simpósio Sul Americano de Cancerologia

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA: UMA REVISÃO DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

Bitencourt R[1], Louro ID[1], Zalcberg I[2]
[1]Universidade Federal do Espírito Santo, [2]Instituto Nacional de Câncer

Introdução: Mutação no domínio quinase do BCR-ABL é a maior causa de resistência ao imatinibe. A identificação da mutação permite modificar o tratamento e por isso vários métodos foram introduzidos no monitoramento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC). **Objetivo e Método**: realizar uma revisão de literatura sobre as terapias para superar a resistência ao imatinibe. **Resultados**: Nilotinibe e dasatinibe são inibidores de tirosina quinase de 2ª geração. O nilotinibe é um inibidor da tirosina quinase BCR-ABL 30 vezes mais potente que o imatinibe in vitro. O dasatinibe é um inibidor da tirosina quinase BCR-ABL e da família da Src. A família Src modula vias de transdução de sinal intracelular que envolve o crescimento, diferenciação, migração e sobrevida celular. A mutação T315I é insensível aos inibidores de 2ª geração. Vários medicamentos estão em desenvolvimento para superar a mutação T315I como bosutinibe, MK0457 (VX-680) e LBH-589. O bosutinibe, in vitro é mais ativo em algumas mutações que o imatinibe. É um inibidor duplo, tanto da tirosina quinase BCR-ABL quanto da família da Src, é inibidor de 3ª geração. O MK0457 (VX-680) é um inibidor da Aurora quinase, demonstra inibir a autofosforilação do BCR-ABL na presença da mutação T315I. A família Aurora é essencial para a progressão da mitose. O LBH-589 é um inibidor da histona deacetilase, que induz a degradação do BCR-ABL. Pode ser usado associado a outros inibidores ou isoladamente na presença da mutação T315I. **Conclusões**: Conhecer o espectro de atuação dos novos medicamentos contra as mutações, principalmente da T315I, possibilita a seleção apropriada da terapia.

7.2 Trabalhos Apresentados no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia

MONITORAMENTO NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA A PARTIR DO DESENVOLVIMENTO DE BANCO DE DADOS

Bitencourt R[1], Louro ID[1], Zalcberg I[2]
[1]*Universidade Federal do Espírito Santo,* [2]*Instituto Nacional de Câncer*

Introdução: A pesquisa translacional é uma disciplina que torna os resultados da pesquisa básica aplicável para o uso clínico. De fato, a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é o paradigma da aplicação dos métodos moleculares na prática clínica, tendo sido a primeira evidência de associação entre uma anomalia cromossômica, o cromossomo Philadelphia (Ph), e uma neoplasia. Recentemente, a translação do desenvolvimento técnico-científico para a clínica permitiu a quantificação do gene de fusão BCR/ABL para avaliação da resposta terapêutica a um inibidor tirosina kinase(ITK) e a avaliação da presença de mutações no domínio tirosina kinase (DTK) do ABL para avaliação de mutações pontuais indicativas de resistência ao ITK. A avaliação da resposta molecular em amostras seriadas de um paciente com LMC ao longo do tratamento com um ITK de primeira ou segunda (ITK2G) e a base para a discriminação precoce de respondedores ótimos em relação aqueles que irão falhar a terapia com ITK. Diante desse cenário a criação de um banco de dados clínico e laboratorial contribui para o acesso rápido de informações de interesse ao tratamento, além de representar um meio confiável e de baixo custo em qualquer tipo de serviço. **Objetivo**: Desenvolver um banco de dados para monitoramento dos pacientes de LMC em uso de TKI e/ou submetidos ao Transplante de Medula Óssea. Método: O desenvolvimento do banco de dados envolveu quatro etapas: (1) levantamento de dados clínicos dos pacientes, (2) levantamento de dados laboratoriais dos pacientes, (3) desenvolvimento de modelo de banco de dados no Microsoft Access® para a sistematização das informações do paciente (Figura 1, 2 e 3) e (4) integração e centralização das informações clínicas e laboratoriais no modelo de banco de dados desenvolvido no Microsoft Access®. **Resultados**: O desenvolvimento do banco de dados facilitou o acesso às informações do pacientes permitindo uma busca rápida, podendo listar os pacientes com resposta molecular maior, aos pacientes que foram submetidos à pesquisa de mutação, o número total de pacientes monitorados, quantos pacientes são monitorados por mês, previsão dos pacientes que retornarão a ser monitorado a cada três meses, entre outras informações. **Conclusão**: O desenvolvimento do banco de dados no Microsoft Access® é importante porque agiliza e facilita o acompanhamento dos pacientes com LMC favorecendo o manejo desses pacientes e a compreensão da evolução da doença, tratamento e recidivas. Além disso, as variantes que envolvem o paciente, tais como as características individuais do paciente, condição clínica, co-morbidade e os resultados laboratoriais podem ser analisados em conjunto em um só lugar, permitindo ganho de tempo para intervir em situações de recaída. Resultados deste banco de dados podem ser encontrados no trabalho de Bonecker et al. HEMO 2012.

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO DOMÍNIO TIROSINA QUINASE (DTK) DO GENE ABL: UMA REVISÃO DAS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO

Bitencourt R[1], *Cappelletti PA*[2], Louro ID[1], Zalcberg I[2]
[1]*Universidade Federal do Espírito Santo,* [2]*Instituto Nacional de Câncer*

Introdução: O tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) foi radicalmente modificado com a introdução dos inibidores de tirosina quinase (ITK). Entretanto, a resistência aos ITK é um problema clínico crescente, que acomete 35% dos pacientes com LMC em fase crônica (FC). Mutações no domínio tirosina quinase (DTK) da proteína BCR-ABL é um dos mais importantes mecanismos de resistência à terapia com ITK. Cerca de cem substituições de diferentes aminoácidos já foram descritas. Estas mutações ocorrem em 30–60% dos pacientes resistentes. A identificação do fenômeno de resistência conferido por mutações individuais, de acordo com o ITK utilizado foram descritos a partir de ensaios de proliferação in vitro, o que permitiu o desenho de um algoritmo de utilização diferencial de ITK de 2º geração. A detecção de mutações no DTK é fundamental para a re-orientação terapêutica do paciente com LMC. Metodologias foram implementadas para viabilizar a identificação de mutações, como o seqüenciamento direto de Sanger (SS), Piro-sequenciamento, Cromatografia Líquida de Alta Performance Denaturante (DHPLC), Curva de análise de alta resolução das temperaturas de Melting (HRM), Reação em Cadeia da Polimerase associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP), Espectrometria de massa e Reação de cadeia da polimerase alelo-específico (ASO-PCR), todas elas variando na sensibilidade e especificidade (Baccarani M et al., 2009). **Objetivo e Método**: Realizar uma revisão de literatura sobre as diferentes metodologias disponíveis para identificação de mutações no DTK do ABL. **Resultados**: O SS é a metodologia mais utilizada e apresenta sensibilidade de 15-25% para detectar mutação, assim, é inadequado para a detecção de mutação de baixo nível somático. A técnica é dependente da qualidade e integridade do RNAm. O piro-sequenciamento baseia-se no seqüenciamento por síntese e fornece a informação do nucleotídeo de interesse em tempo real. A sensibilidade é de 5% e é altamente específico, entretanto, é necessário o conhecimento prévio da mutação sob investigação. O HRM é uma técnica relativamente rápida, muito sensível à qualidade da preparação do DNA e apresenta sensibilidade de 5%. O DHPLC baseia-se na retenção diferencial de espécies de DNA heteroduplex e homoduplex e apresenta sensibilidade de cerca de 1%. RFLP-PCR é usado como triagem rápida de mutações já descritas e a principal limitação sobre a sensibilidade deste método é a eficiência da digestão de restrição. A espectrometria de massa detecta baixos níveis de mutação, de forma rápida, com sensibilidade de 0,05-0,5%, mas apresenta alto custo. O ASO-PCR é de fácil execução e permite uma triagem rápida. Apresenta sensibilidade 0.01–0.001%, entretanto, é necessário o conhecimento prévio de mutações. Além disso, não requer preparações adicionais de produtos pós-PCR como a etapa de purificação para o SS. **Conclusão**: A escolha da metodologia adotada para identificação de mutação deve buscar um equilíbrio entre sensibilidade, especificidade, conveniência e custo, proporcionando resultados seguros, confiáveis e rápidos. Entretanto, a escolha feita pelos laboratórios na rotina é o SS por além identificar as mutações já descritas, permitir identificações de novas mutações.

7.3 Artigo Publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Review Article

Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloid leukemia

Roberta Bitencourt[1]
Ilana Zalcberg[2]
Iúri Drumond Louro[1,3]

[1] Master Program in Biotechnology, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES, Brazil
[2] Bone Marrow Transplantation Center – CEMO, Instituto Nacional do Cancer – INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[3] Center for Human and Molecular Genetics, Department of Biological Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES, Brazil

The development of point mutations in the BCR-ABL kinase domain is the main reason for imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. Different detection methods are used in chronic myeloid leukemia monitoring, such as direct sequencing, denaturing high performance liquid chromatography and allele specific polymerase chain reaction. Mutation analysis has become mandatory during patient workup of chronic myeloid leukemia in order for the physician to choose the most suitable tyrosine kinase inhibitor. This article, a review of possible therapies used to overcome imatinib resistance, investigates the current position by searching the PubMed electronic database using the following keywords: imatinib, dasatinib, nilotinib, aurora kinase, SRC kinase, mutation, treatment, drugs and resistance. New tyrosine kinase inhibitors include BCR-ABL kinase selective inhibitors, dual ABL/SRC kinase inhibitors and aurora kinase inhibitors. Awareness of the spectrum of new drugs against mutations, in particular the T315I mutation, makes it possible to properly select the best therapy for each patient.

Keywords: *Leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive/drug therapy; Protein-tyrosine kinases; Drug resistance, neoplasm; Antineoplastic agents/therapeutic use; Piperazines/therapeutic use; Pyrimidines/therapeutic use*

Introduction

The eight-year IRIS study, which compared the therapeutic results of interferon and imatinib (Glivec®), confirmed the effectiveness of imatinib and its long-term safety in chronic myeloid leukemia (CML).[1] Imatinib is a tyrosine-kinase inhibitor which binds to the inactive form of *BCR-ABL* tyrosine kinase, preventing adenosine triphosphate (ATP) from binding.[2]

The complete cytogenetic response for patients treated with imatinib as the first line drug is 83% and the overall survival rate is 85% as revealed in the eight-year IRIS study.[1] In addition, according to the European LeukemiaNet, achieving cytogenetic and molecular responses during the period reduces the risk of relapse, progression and death.[3]

Nonetheless, some patients develop resistance to imatinib even after attaining a response. Resistance mechanisms are heterogeneous and may involve *BCR-ABL* gene amplification, gene mutation, incomplete inhibition and overexpression of the multidrug resistance gene (P-glycoprotein) which may favor the selection of resistant cells. Resistance is commonly due to mutations within the *BCR-ABL* kinase domain.[4,5] More than seventy different amino acids substitutions in this domain have been described, but approximately 85% of all cases carry one of the following fifteen mutations: T315I, Y253F/H, E255K/V, M351T, G250E, F359C/V, H396R/P, M244V, E355G, F317L, M237I, Q252H/R, D276G, L248V, F486S.[6]

If the patient reaches a suboptimal response or fails to respond to imatinib, the European LeukemiaNet recommends mutation identification before changing with another tyrosine kinase inhibitor or to another therapy (Table 1).[3]

Different methods for mutation detection were introduced in CML handling, such as direct sequencing, denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) and allele specific polymerase chain reaction (ASO-PCR). Direct sequencing is the most used method; it is the gold standard in diagnostic routine, showing mutation detection sensitivity of 10-25% compared to DHPLC (5-10%) and ASO-PCR (0.1-1%).[3,7-9]

More sensitive detection methods have identified that some mutations pre-exist before imatinib treatment, but are normally detected after clonal selection following tyrosine-kinase inhibition, showing that the tyrosine kinase inhibitor has a selective

Conflict-of-interest disclosure:
The authors declare no competing financial interest

Submitted: 7/22/2011
Accepted: 10/21/2011

Corresponding author:
Iúri Drumond Louro
Center for Human and Molecular Genetics, Department of Biological Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES, Brazil
Av. Marechal Campos, 1468
29043-900 – Vitória, ES, Brazil
iurilouro@yahoo.com

www.rbhh.org or www.scielo.br/rbhh

DOI: 10.5581/1516-8484.20110124

Table 1 - Definition of suboptimal response and imatinib therapy failure according to the European LeukemiaNet[3]

Evaluation period	Suboptimal response	Failure to respond to imatinib
3 months	Absence of cytogenetic response (CgR)	Incomplete hematological response (HR)
6 months	CgR but less than partial CgR	Absence of CgR
12 months	Partial CgR (presence of 1-35% Ph+ cells)	CgR but less than partial CgR
18 months	Molecular response (MR) but less than major MR (ratio of BCR-ABL/ABL< 0.1%, corresponding to a ≥ 3 log reduction in BCR-ABL transcripts)	CgR but less than complete CgR
Anytime during treatment	Major MR loss; mutations still sensitive to imatinib	Complete HR loss; complete CgR loss; low-sensitivity of mutations to Imatinib; presence of chromosome abnormalities.

influence over the total cell population. Other mutations can be acquired during disease progression in association with genetic instability.[9,10] *In vitro* studies have identified mutations that can decrease tumor response to second generation tyrosine kinase inhibitors. Sensitivity is described by the concentration of drug necessary to inhibit 50% of wild type *BCR-ABL* tyrosine kinase (IC_{50}) *in vitro*, therefore, the smaller the IC50, the more powerful the drug is. Mutations are classified according to the IC_{50} of each tyrosine kinase inhibitor as sensitive, intermediately sensitive or insensitive.[11-16]

Some studies have described that after treatment discontinuity, a proliferative disadvantage for the mutant clone (deselection) can occur. This effect seems to be less frequent in patients with the T315I mutation compared to mutations in the phosphate loop region.[17]

In vitro sensitivity classifications are not completely accurate and need clinical validation. When validated, they are very useful to guide the proper therapeutic intervention after treatment failure. Furthermore, classification based on *in vitro* studies is not simple, since a particular mutation can be described as resistant or sensitive to the same inhibitor, for instance, the G250E mutation.[14]

In vitro studies do not take into account in vivo variables such as drug absorption, distribution, metabolism, transportation and excretion, which greatly influence the overall clinical response to therapy. Moreover, clinical response also varies from patient to patient, depending on treatment adherence, interaction with food and/or medicines, as well as genetic background.[18]

Therefore, mutation analysis becomes mandatory for the physician's decision in order to choose the most adequate tyrosine kinase inhibitor, always taking into consideration other factors such as disease stage, patient characteristics, risk factors and co-morbidities.[19]

This article, a review of possible therapies used to overcome imatinib resistance, investigates the current position by searching the PubMed electronic database using the following keywords: imatinib, dasatinib, nilotinib, aurora kinase, SRC kinase, mutation, treatment, drugs and resistance.

Novel *BCR-ABL* tyrosine kinase inhibitors

Novel tyrosine kinase inhibitors include selective inhibitors, dual ABL/SRC kinase inhibitors and aurora kinase inhibitors.[20,21]

BCR-ABL tyrosine kinase

Tyrosine kinases participate in fundamental cell processes such as proliferation, adaptation and apoptosis through interactions with several proteins involved in oncogene signal transduction pathways, and are responsible for gene transcription activation or suppression. These interactions are mediated by adapter proteins such as the growth factor receptor-bound protein-2 (Grb2), growth factor receptor-binding protein complex (Gab2), SRC kinase family and focal adhesion kinases (FAK).[22]

The main pathways involved in *BCR-ABL* signal transduction are: the RAt Sarcoma (RAS) pathway, mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK), extracellular signal regulated kinase pathway (ERK), phosphatidyl-inositol-3-kinase pathway (PI3K), signal transduction and activator of transcription 5 (STAT5) and kB nuclear factor pathway (NFkB).[22-24]

SRC kinase family

The SRC kinase family of proteins participates in signal transduction processes, contributing to cell growth regulation. This family structurally comprises nine homologous intracellular receptors (SRC, FYN, YES, BLK, YRK, HCK, LCK and LYN).[23] There are multiple tyrosine residues in SH3-SH2 regions of *BCR-ABL* that are phosphorylated by HCK, LYN and FYN kinases (SRC family), increasing their activity. During CML progression, LYN and HCK overexpressions and/or activation can occur, suggesting a relationship with imatinib resistance.[25-27]

Aurora kinase

The aurora kinase family is essential for mitotic progression. Aurora kinase A acts in the formation of the mitotic fuse and in the centromere maturation, allowing chromosome segregation into daughter cells. Aurora kinase B, in turn, is essential for the cytokinesis and aurora kinase C is mostly restricted to germinative cells.[28]

Dasatinib

Dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb) is a multi-target inhibitor of *BCR-ABL* tyrosine kinase, SRC family kinases, platelet-derived growth factor (PDGF) and c-kit receptors. It acts on the adenosine triphosphate (ATP) binding site of ABL, regardless of the site activation state; it is 325 times more powerful than the imatinib in respect to wild type *BCR-ABL* cells and has a much smaller IC50.[13,29,30]

High response rates to dasatinib have been observed in patients with L248, Y253, E255, F359, H396 mutations. In comparison, T315, F317 and V299 mutations are associated with dasatinib resistance.[11]

While imatinib is a P-glycoprotein substrate which is highly expressed in hematopoietic stem-cells, dasatinib is not.[31] Similar to imatinib, dasatinib is metabolized in the liver, mainly by cytochrome P450 and thus potentially presents drug interactions.[32] Dasatinib is approved for second-line treatment in patients with CML who were not successfully treated using imatinib. Moreover, dasatinib is effective as initial treatment of CML patients in the chronic phase, rapidly reaching complete cytogenetic response.[33,34]

Phase II and III studies on dasatinib showed faster and more prominent molecular and cytogenetic responses compared to imatinib.[35]

Nilotinib

Nilotinib (Tasigna®, Novartis) has an imatinib-derived structure. Therefore, nilotinib binds to a *BCR-ABL* inactive conformation, occupying the same site as ATP in the enzyme active conformation. It also inhibits the platelet-derived growth factor tyrosine kinase (PDGF) and c-kit receptors, showing an efficiency similar to imatinib and having a higher selectivity for *BCR-ABL*.[36,37]

In wild type *BCR-ABL* cells, nilotinib is 20 times more potent than imatinib, inducing apoptosis with significantly smaller concentrations compared to imatinib. Nilotinib is effective in patients with most mutations, except for E255K/V, F359C/V, Y253H and T315I mutations.[12,13]

Nilotinib presents differences in efflux patterns as it does not use organic cation transporters (OCT-1).[38] Similar to imatinib and dasatinib, nilotinib is metabolized in the liver, mainly by the cytochrome P450 and thus potentially presents drug interactions.[32]

Nilotinib is approved as a second-line treatment in the chronic and accelerated phases of CML, in CML patients resistant or intolerant to imatinib, minimal cross-intolerance to imatinib and in the presence of few adverse effects.[32,39] Nilotinib presents a fast and complete cytogenetic response in the initial chronic phase of almost all patients, with a low toxicity profile.[40]

Nilotinib phase II studies showed faster and more intense molecular and cytogenetic responses when compared to imatinib and only one patient in this study advanced to the accelerated or blastic phase. Phase III nilotinib studies showed greater molecular and cytogenetic responses and more patients reached undetectable levels of the disease.[35]

Bosutinib

Bosutinib (SKI-606, Wyeth), originally identified as a SRC inhibitor, is a potent anti-proliferative and pro-apoptotic agent of *BCR-ABL* cell lines. It is similar to dasatinib, but it does not inhibit growth factor tyrosine kinase receptors, such as PDGFR and epidermal growth factor receptor (EGFR). This feature may turn bosutinib less toxic than dasatinib, but a clinical comparison is necessary to confirm this.[41,42]

Tyrosine kinase inhibition by bosutinib was similar to that observed with imatinib, but demanding lower concentrations. At high concentrations bosutinib can inhibit the multiple drug-resistance protein, which has contributed to improved pharmacokinetic effects.[42,43] *In vitro* studies suggest that T315I and V299L mutations are resistant to bosutinib.[16]

In phase II trials, bosutinib was effective in patients who were resistant or intolerant to imatinib, including patients with mutations in the kinase domain. Currently, bosutinib is in phase III trials.[44]

Ponatinib

Ponatinib (AP24534) was developed to interact with the inactive ABL conformation at multiple sites and with the T315I mutation, providing high affinity and efficacy. Therefore, it also works against other imatinib-resistant mutations.[45]

Ponatinib has been shown to inhibit SRC family kinases, PDGFRα and c-KIT, but not Aurora kinases, which distinguishes it from other T315I inhibitors in development.[45]

In a phase I clinical trial ponatinib was used to treat 67 patients resistant to imatinib, dasatinib and nilotinib and passed safety requirements. Among these patients, 72% presented mutations in *BCR-ABL* at the beginning of the study or had a documented mutation story, including the T315I and F317L mutations. Moreover, 82% of patients were in the chronic phase, presented the T315I mutation and achieved a greater CgR.[46]

Saracatinib

Saracatinib (AZD0530, Astra-Zeneca) is a dual SRC/ABL kinase inhibitor. Saracatinib is able to overcome Y253F and E255K but not T315I mutations. If its inhibitory effect is a result of a direct effect on SRC, on ABL kinases or on both of them, is still a matter of debate.[47,48]

Saracatinib has been tested in CML animal models and in clinical trials for solid tumors such as recurrent or

metastatic head and neck squamous cell carcinoma. It has not entered CML clinical trials yet.[49,50]

INNO-46 (NS-187, Nippon-Shinyaku)

INNO-46 (NS-187, Nippon-Shinyaku) is a potent dual *BCR-ABL*/LYN tyrosine kinase inhibitor. It is 25-55 times more powerful than imatinib regarding the *BCR-ABL* self-phosphorylation block. It also inhibits PDGFR and c-Kit receptor phosphorylation with a potency similar to imatinib. Studies suggest that LYN kinase inhibition can break the imatinib-resistant disease progression, being less sensitive to mutations in ABL kinase domain than other inhibitors, such as imatinib. However, it does not inhibit the T315I mutation and additional studies are needed to better evaluate the effectiveness of INNO-406 in patients who have developed resistance or intolerance to imatinib and to other tyrosine kinase inhibitors.[27,51-53]

In INNO-406 phase I studies, tolerance was for 240 mg doses twice a day and a high CgR was reached by six patients. From the 56 patients in the study, 71% were resistant and 29% were intolerant to imatinib, 26 patients were intolerant or resistant to dasatinib and 20 patients presented resistance or intolerance to nilotinib. Because it is a third-line treatment, a lower response rate is expected.[53]

MK-0457

MK-0457 (Merck, originally developed by Vertex Pharmaceutical as VX-680) is an aurora kinase inhibitor, which presents anti-proliferative and pro-apoptotic effects in a series of tumor cell lines.[28] It has been shown to bind to 37 of 119 tested kinases and to imatinib-resistant mutant forms.[54]

Different from imatinib, which binds deeply into the ABL kinase domain, MK-0457 is anchored by four hydrogen bridges, suggesting a mechanism for T315I mutation inhibition and an eventual clinical application.[55]

During MK-0457 phase I and phase II performance studies, important cardiac events, such as prolongation of the QT interval, were observed, causing additional MK-0457 trials to be cancelled and drug development was interrupted.[56]

ON012380

ON012380 (Onconova) is a *BCR-ABL* inhibitor, active against 100% of imatinib-resistant mutations including the T315I mutation. This is because ON012380 does not compete with ATP to inhibit *BCR-ABL*, but with its substrates suggesting that molecules with action sites out of the kinase domain can be good therapeutic agents against imatinib-resistant leukemias.[57]

In comparison to imatinib, ON012380 is 10 times more powerful. Besides being selective against *BCR-ABL*, it is likely that ON012380 is also effective against cells in which resistance to imatinib is due to overexpression or activation of LYN kinases.[57,27]

ON012380 has not entered clinical trials and so its effectiveness and safety in vivo have not been confirmed yet.[58]

Conclusion

Mutation analysis is important to guide clinical decisions regarding treatment, especially for patients who suspend imatinib due to intolerance or resistance. It would be ideal for all services to have access to mutation analysis tests before choosing the second or third tyrosine kinase inhibitors, since the identified mutation can influence the response to tyrosine kinase inhibitors. It is mandatory to know the action spectrum of new drugs against mutations, mainly T315I and to always take into account other variables involved in patient care, such as the individual characteristics of patients, clinical condition, comorbidities and treatment adaptation.

References

1. Fava C, Saglio G. Can we should improve on frontline imatinibe therapy for chronic myeloid leukemia? Semin Hematol. 2010;47 (4):319-26.
2. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2006; 355(23):2408-17. Comment in: N Engl J Med. 2007;356 (17): 1780; author reply 1780.
3. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2009; 27(35):6041-51. Comment in: J Clin Oncol. 2010;28(18):e310; author reply e311.
4. Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galieta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinibe in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. Lancet Oncol. 2003;4(2):75-85.
5. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Muller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia. 2002;16(11):2190-6.
6. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007;8(11):1018-29.
7. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell. 2002;2(2):117-25. Comment on: Cancer Cell. 2002;2(2):99-102.
8. Kantarijan H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine inhibitors: practical advice on the

use and interpretation of monitoring methods. Blood. 2008; 111(4):1774-80.

9. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. Blood. 2002;100(3):1014-8.
10. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2005;23(18):4100-9.
11. Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. Blood. 2009;114(24):4944-53. Comment in: Blood. 2009;114(24):4914-5.
12. Hughes T, Saglio G, Branford S, Soverini S, Kim DW, Muller MC, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. J Clin Oncol. 2009;27(25):4204-10
13. O' Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al. In vitro activity of BCR-ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. Cancer Res. 2005;65(11):4500-05.
14. Brandford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second line tyrosine kinase therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinibe failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? Blood. 2009;114(27):5426-34.
15. O' Hare T, Eide CA, Deininger MW. BCR-ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. Blood. 2007;110(7):2242-9.
16. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistroni V, Perini P, Marega M, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. J Clin Oncol. 2009;27(3): 469-71. Comment in: J Clin Oncol. 2010;28(11):e169-71; author reply e172.
17. Hanfstein B, Müller MC, Kreil S, Ernst T, Schenk T, Lorentz C, et al. Dynamics of mutant BCR-ABL-positive clones after cessation of tyrosine kinase inhibitor therapy. Haematologica. 2011;96 (3):360-6. Comment in: Haematologica. 2011;96(3):347-9.
18. Soverini S, Rosti G, Iacobucci I, Baccarani M, Martinelli G. Choosing the best second-line tyrosine kinase inhibitor in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients harboring BCR-abl kinase domain mutations: how reliable is the IC50? Oncologist. 2011;16 (6):868-76.
19. Jabbour E, Jones D, Kantarjian HM, O'Brien S,Tam C, Koller C,et al. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. Blood. 2009; 114(10):2037-43.
20. Bumbea H, Vladareanu AM, Voican I, Cisleanu D, Barsan L, Onisai M. Chronic myeloid leukemia therapy in the era of tyrosine kinase inhibitors - the first molecular targeted treatment. J Med Life. 2010;3(2):162-6.
21. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. Nat Rev Cancer. 2007;7(5):345-56.
22. Alvarez RH, Jantarjian H, Cortes JE. The biology of chronic myelogenous leukemia: implications for imatinibe therapy. Semin Hematol. 2007;(1 Suppl 1):S4-S14.
23. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat Rev Cancer. 2005;5(3):172-83.
24. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia. 2004;18(2):189-218.
25. Kantarjian HM, Giles F, Cardama AQ, Cortes J. Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2007;13(4):1089-97.
26. Li S. Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leucemia and acute lymphoblastic leucemia. Leuk Lymphoma. 2008;49 (1):19-26.
27. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. Blood. 2003;101(2):690-8.
28. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. Nat Med. 2004;10(3):262-7. Erratum in: Nat Med. 2007;13(4):511. Comment in: Nat Med. 2004;10(3):234-5.
29. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, Juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. Cancer Res. 2006;66(1):473-81.
30. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. Science. 2004;305(5682):399-401. Comment in: Science. 2004;305 (5682):319-21.
31. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. 2006;355(24):2531-41. Comment in: N Engl J Med. 2006;354(24):2594-6. N Engl J Med. 2006;355(10):1062-3; author reply 1063-4.
32. McFarland KL, Wetzstein GA. Chronic myeloid leukemia therapy: focus on second-generation tyrosine kinase inhibitors. Cancer Control. 2009;16(2):132-40.
33. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010;362(24):2260-70. Comment in: N Engl J Med. 2010;363(17):1672-3; author reply 1673-5. Expert Opin Pharmacother. 2011;12(1):157-63. N Engl J Med. 2010;363(17):1672-3; author reply 1673-5. N Engl J Med. 2010;362(24):2314-5.
34. Cortes JE, Jones D, O'Brien S, Jabbour E, Ravandi F, Koller C, et al. Results of dasatinib therapy in patients with early chronic-phase chronic myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2010;28(3):398-404. Comment in: J Clin Oncol. 2010;28(3):363-5.
35. Kantarjian HM, Baccarani M, Jabbour E, Saglio G, Cortes JE. Second-generation tyrosine kinase inhibitors: the future of frontline CML therapy. Clin Cancer Res. 2011;17(7):1674-83.
36. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brüggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant BCR-ABL. Cancer Cell. 2005;7(2):129-41. Erratum in: Cancer Cell. 2005;7(4):399. Mohammed, Azam [corrected to Azam, Mohammad].
37. Golemovic M, Verstovsek S, Giles F, Cortes J, Manshouri T, Manley PW, et al. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of BCR-ABL, has in vitro activity against imatinib-resistant chronicmyeloid leukemia. Clin Cancer Res. 2005;11(13):4941-7.
38. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino AC, Cambareri AC, et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant

of the intracellular uptake of imatinibe but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. Blood. 2006;108(2):697-704.

39. Swords R, Mahalingam D, Padmanabhan S, Carew J, Giles F. Nilotinib: optimal therapy for patients with chronic myeloid leukemia and resistance or intolerance to imatinib. Drug Des Devel Ther. 2009; 3:89-101.

40. Cortes JE, Jones D, O'Brien S, Jabbour E, Konopleva M, Ferrajoli A, et al. Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. J Clin Oncol. 2010; 28(3):392-7. Comment in: J Clin Oncol. 2010; 28(3):363-5.

41. Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, et al. In vitro and In vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl Inhibitor, against imatinib-resistant BCR-ABL+ neoplastic cells. Cancer Res. 2006;66(23):11314-22.

42. Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, et al. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual Inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. Cancer Res. 2003; 63(2):375-81.

43. Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Apáti Á, Magócsi M, Német K, Orfi L, et al. Interaction of nilotinibe, dasatinib and bosutinibe with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. Br J Pharmacol. 2009;158(4): 1153-64.

44. Bruemmendorf TH, Cervantes F, Kim D, Chandy M, Fischer T, Hochhaus A, et al. Bosutinib is safe and active in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. J Clin Oncology. 2008;26:372s. [abstract 7001] . Presented in: ASCO Annual Meeting Proceedings. [cited 2010 Jul 27]. Available from: http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15_suppl/7001

45. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X , Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a Pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the t315i mutant and overcomes mutation-based resistance. Cancer Cell. 2009;16(5):401-12.

46. Cortes J, Talpaz M, Bixby D, Deininger M, Shah N, Flinn IW, et al. A phase 1 trial of oral ponatinib (AP24534) in patients with refractory chronic myelogenous leukemia (CML) and other hematologic malignancies: emerging safety and clinical eesponse findings. In: 52º Annual Meeting and Exposition; 2010. Dez. 4-7; Florida, 2010. Anais. p. 210.

47. Nowak D, Boehrer S, Hochmuth S, Trepohl B, Hofmann W, Hoelzer D, et al. Src kinase inhibitors induce apoptosis and mediate cell cycle arrest in lymphoma cells. Anticancer Drugs. 2007;18 (9):981-95.

48. Gwanmesia PM, Romanski A, Schwarz K, Bacic B, Ruthardt M, Ottmann OG. The effect of the dual Src/Abl kinase inhibitor AZD0530 on Philadelphia positive leukaemia cell lines. BMC Cancer. 2009;9:53.

49. Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Botta M. Novel dual Src/Abl inhibitors for hematologic and solid malignancies. Expert Opin Investig Drugs. 2010;19(8):931-45.

50. Fury MG, Baxi S, Shen R, Kelly KW, Lipson BL, Carlson D, et al. Phase II study of saracatinib (AZD0530) for patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Anticancer Res. 2011;31(1):249-53.

51. Niwa T, Asaki T, Kimura S. NS-187 (INNO-406), a BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor. Anal Chem Insights. 2007;2:93-106.

52. Kimura S, Naito H, Segawa H, Kuroda J, Yuasa T, Sato K, et al. NS-187, a potent and selective dual BCR-ABL/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. Blood. 2005;106(12):3948-54.

53. Kantarjian H, le Coutre P, Cortes J, Pinilla-Ibarz J, Nagler A, Hochhaus A, et al. Phase I study of INNO-406, a dual Abl/Lyn kinase inhibitor, in Philadelphia chromosome-positive leukemias after imatinib resistance or intolerance. Cancer. 2010;116(11): 2665-72.

54. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, Velasco AM, Fabian MA, Treiber DK, et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(31):11011-6.

55. Young MA, Shah NP, Chao LH, Seeliger M, Milanov ZV, Biggs WH, et al. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutantin complex with the Aurora kinase Inhibitor VX-680. Cancer Research. 2006;66(2):1007-14.

56. Green MR, Woolery JE, Mahadevan D. Update on aurora kinase targeted therapeutics in oncology. Expert Opin Drug Discov. 2011;6(3):291-307.

57. Gumireddy K, Baker SJ, Cosenza SC, John P, Kang AD, Robell KA, et al. A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(6):1992-7. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(15):5635.

58. Soverini S, Iacobucci I, Baccarani M, Martinelli G. Targeted therapy and the T315I mutation in Philadelphia-positive leukemias. Haematologica. 2007;92(4):437-9.

xxx