

Desenvolvimento e Validação de um Método Colorimétrico para Monitoramento da Atividade da Abl Quinase na Triagem de Fármacos para Leucemia Mieloide Crônica

Diego M. Martins^{1*} (PG), Ana L. A. Mendes² (G), Ana C. D. Magalhães² (G), Philipe O. Fernandes² (PG), Mariana R. Almeida¹ (PQ), Adolfo H. Moraes¹ (PQ)

¹Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas (ICEx), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 31.270-901

²Departamento de Produtos Farmacêuticos/Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 31.270-901

ddmagno838@gmail.com

RESUMO

A Abl quinase desempenha papel central em processos celulares fundamentais, sendo sua forma hiperativa diretamente associada ao desenvolvimento da leucemia mieloide crônica (LMC). Considerando a importância da Abl como alvo terapêutico e as limitações dos métodos convencionais de ensaio de quinases, este trabalho descreve o desenvolvimento e validação de um método colorimétrico para realização de ensaio de atividade da Abl. A metodologia permite quantificar o fosfato inorgânico liberado sem necessidade de substratos peptídicos ou anticorpos. O ensaio foi validado com sucesso e demonstrou aplicabilidade na triagem de inibidores, como evidenciado com o imatinibe. A abordagem culminou no desenvolvimento de uma tecnologia patenteada, oferecendo uma alternativa simples, econômica e eficaz para a triagem funcional de inibidores, com potencial impacto no desenvolvimento de terapias para LMC e outras doenças associadas à Abl.

Palavras-chave: Atividade ATPase, Quinase de Abelson (Abl), Método colorimétrico, Ensaios de atividade, Triagem de inibidores

Introdução

A quinase de Abelson (Abl) (Figura 1a) é uma enzima envolvida em processos celulares como a polimerização de actina, mudanças estruturais na cromatina, respostas a danos ao DNA e vários outros essenciais para a proliferação, apoptose e diferenciação celular (1,2).

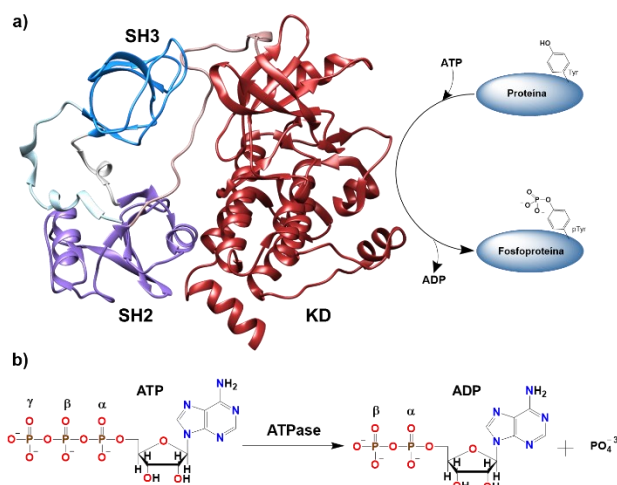


Figura 1. a) Estrutura da Abl mostrando o domínio catalítico (KD) (marrom) e os domínios regulatórios SH2 (roxo) e SH3 (azul), e esquema da reação de fosforilação de proteína catalisada pela Abl. b) Reação secundária catalisada pela Abl.

Alterações genéticas que levam a expressão de uma forma superativa da Abl levam ao desenvolvimento da leucemia mieloide crônica

(LMC). Fazendo com que essa enzima se torne um alvo terapêutico relevante para o desenvolvimento de fármacos (3). A avaliação da atividade de quinases, de modo geral, ainda depende majoritariamente de metodologias complexas, dispendiosas ou que geram resíduos radioativos (4). Descobrimos, previamente que a Abl possui atividade ATPase intrínseca, ou seja, é capaz de catalisar a hidrólise do ATP mesmo na ausência de substrato (Figura 1b). Diante disso, o presente trabalho consistiu de utilizar essa reação secundária para o desenvolvimento de um ensaio baseado na quantificação do fosfato inorgânico liberado. O método contorna a limitação da ausência de cromóforos nos reagentes e produtos da reação de fosfotransferase catalisada pela quinase e oferece uma alternativa simples, econômica e adaptável à triagem de inibidores.

Experimental

Expressão, purificação e caracterização da Abl

A proteína Abl recombinante foi expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3) em meio Luria-Bertani (LB) e purificada por três etapas cromatográficas: duas de afinidade a níquel e uma de exclusão por tamanho. O enovelamento, pureza e identidade da proteína foram confirmados por SDS-PAGE e espectroscopia de RMN (5,6).

Ensaios de atividade

As reações enzimáticas foram realizadas em tampão tris-HCl 20 mM contendo 2,5 mM de MgCl₂ e 1 % v/v de DMSO. A quantificação do fosfato liberado foi realizada pelo método colorimétrico do verde de



malaquita, um protocolo adaptado a partir do descrito por Baykov (7). O método foi validado quanto a precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, efeito de matriz e interferência. Para avaliar a aplicabilidade do método na triagem de inibidores, foram realizados ensaios na presença do imatinibe – um fármaco usado no tratamento da LMC (8).

Resultados e Discussão

Validação do método

O ensaio apresentou linearidade satisfatória na faixa de 0 a $8,75 \mu\text{molL}^{-1}$ de fosfato inorgânico, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9986$ (Figura 2). O teste de Cochran indicou homocedasticidade e os resíduos foram distribuídos de forma aleatória. A inclinação da curva foi de 0,0621, e o intercepto, 0,0162. A exatidão foi avaliada por recuperação em três níveis de concentração ($1,25$; $5,00$; $8,75 \text{ mmolL}^{-1}$). Os valores médios de recuperação foram de 101,35%, 105,14% e 102,51%, respectivamente, todos dentro dos critérios de aceitação recomendados (80–120%). O método apresentou excelente precisão, com baixos coeficientes de variação e valores de HorRat inferiores ao limite de aceitação, tanto sob condições de repetibilidade quanto de precisão intermediária. Esses resultados demonstram que o método é confiável nas faixas de concentração. Por fim, a curva matrizada não apresentou diferença significativa em relação a curva construída em água deionizada.

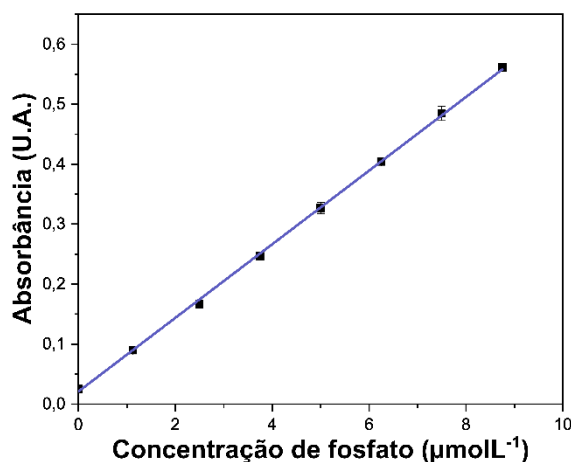


Figura 2. Curva de calibração para quantificação do íon fosfato via o método do verde de malaquita substituindo-se o surfactante Tween 20 pelo Triton X-100 na abordagem proposta por Baykov.

Ensaios de atividade enzimática

A caracterização biofísica da amostra da enzima purificada demonstrou que a mesma se encontra pura e enovelada, assegurando sua qualidade. Ensaios de inibição com imatinibe revelaram inibição concentração-dependente da atividade ATPase da Abl, permitindo calcular a constante de dissociação ($K_d = 4,7 \pm 0,6 \mu\text{molL}^{-1}$) (Figura 3). Essa correlação entre a atividade ATPase e a atividade quinase é inédita e fornece uma abordagem funcional alternativa e simplificada para triagens in vitro de inibidores da Abl.

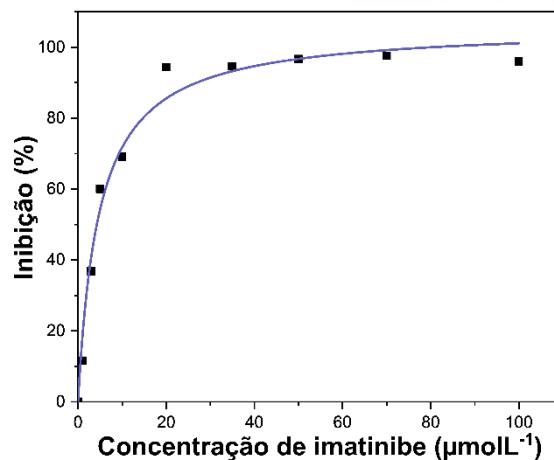


Figura 3. Efeito da concentração do inibidor imatinibe na porcentagem de inibição da atividade ATPase da Abl avaliada pelo método do verde de malaquita. Ensaio com a Abl ($1,6 \mu\text{molL}^{-1}$) no meio reacional contendo $1,6 \mu\text{molL}^{-1}$ de ATP em tampão 20 mmolL^{-1} de tris-HCl, pH = 7,5, 1% v/v de DMSO e $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ de MgCl_2 , variando-se a concentração do inibidor.

Conclusões

O método colorimétrico baseado no verde de malaquita foi validado com sucesso para quantificação da atividade ATPase da Abl, oferecendo uma abordagem direta, econômica e sensível. A eliminação da necessidade de substratos peptídicos ou anticorpos representa um avanço importante na redução de custos para ensaios de quinases. Esta abordagem culminou no desenvolvimento de uma tecnologia inovadora, atualmente protegida por patente (9), que compreende um kit para triagem de inibidores da Abl, com potencial para impulsionar o desenvolvimento de novos fármacos contra a LMC e outras doenças associadas à disfunção desta quinase.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela FAPEMIG, CNPq e CAPES.

Referências

1. El-Tanani, M., Nsairat, H. *Pathology, research and practice*. **2024**, 254, 155161.
2. O. Hantschel, G. Superti-Furga, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 33–44.
3. D. M. Martins, P. O. Fernandes. *Chembiochem.* **2024**, 25(23), e202400296.
4. Gao, J., Jian, J., Jiang, Z., & Van Schepdael, A. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **2023**, 223, 115166.
5. Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. *Guide to protein purification* (2ª ed). Elsevier/Academic Press, 2009.
6. E. Barile, M. Pellecchia, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4749–4763.
7. Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., Avaeva, S. M. *Analytical biochemistry*. **1998**, 171(2), 266–270.
8. Cohen, P., Cross, D., & Jänne, P. A. *Nature reviews. Drug discovery*. **2021**, 20(7), 551–569.
9. D. M. Martins. P. O. Fernandes. B. R. Patente 10 2025 005161 3, **2025**.