



## Produção de anticorpos monoclonais para as enzimas humanas uridina fosforilase-1 e timidina fosforilase: alvos moleculares para o tratamento do câncer.

Rafael dos Santos Mazzuca<sup>1,2</sup>, Fágner Henrique Heldt<sup>2</sup>, Candida Deves<sup>3</sup>, Daiana Renck<sup>3</sup>, Diógenes Santiago dos Santos<sup>3</sup>, Denise Cantarelli Machado<sup>2</sup> (orientador)

<sup>1</sup>Faculdade de Biociências, <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular- Instituto de Pesquisas Biomédicas(IPB), <sup>3</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (IPB) - PUCRS.

### Resumo

As vias moleculares que promovem a angiogênese são possíveis alvos para o tratamento do câncer. Existem algumas enzimas chaves na via de salvamento de pirimidinas, como a uridina fosforilase (UP) e timidina fosforilase (TP). A UP é importante para a quimioterapia do câncer por ser uma das responsáveis pela ativação ou degradação de alguns análogos quimioterápicos, e pelo controle da concentração de uridina no plasma. A TP é uma enzima chave na promoção da angiogênese através da estimulação da migração de células endoteliais para o ambiente tumoral, cuja expressão está relacionada com maior densidade de microvasos, estágio tumoral avançado e metástase. A produção de anticorpos contra essas proteínas auxiliará no diagnóstico da doença e, futuramente, após humanização dos anticorpos, poderá ser utilizado no tratamento do câncer uma vez que elas encontram-se super-expressas e com sua atividade aumentada principalmente em tumores sólidos.

Este trabalho tem como objetivo geral produzir anticorpos monoclonais para as enzimas hUP1 e hTP. Entre os objetivos específicos estão imunizar os animais com as proteínas UP e TP purificadas, produzir e selecionar os hibridomas, clonar e expandir os hibridomas e por fim produzir e purificar em larga escala os anticorpos monoclonais.

Serão utilizados camundongos BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas, que serão imunizados, com uma injeção intraperitoneal com 30 µg da proteína emulsificada em adjuvante completo de Freund (1ª imunização) e 30 µg de proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (2ª e 3ª imunizações) de 15 em 15 dias. Após 45 dias será coletada uma amostra de soro para a detecção dos anticorpos específicos para as proteínas de

interesse (UP e TP) pela técnica de ELISA. O animal que apresentar o maior título de anticorpo receberá uma injeção intravenosa de reforço, contendo 30 µg da proteína em soro fisiológico. Cinco dias após o reforço, o animal será eutanasiado para a retirada do baço para obtenção dos esplenócitos que serão fusionados com células de mieloma P5363 com polietilenoglicol (PEG). Os hibridomas serão selecionados em meio contendo HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina).

Os hibridomas positivos, que apresentarem especificidade para a proteína de interesse através do teste ELISA, serão clonados e expandidos, visando uma produção em larga escala e posteriormente a purificação destes anticorpos.