

P 3468**Padronização de marcadores de ativação de endotélio para microscopia confocal**

Amanda Pasqualotto, Carolina Uribe-Cruz, Jorge Luiz dos Santos, Themis Reverbel da Silveira
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Introdução: A atresia biliar (AB) é uma doença que inicia exclusivamente na infância, consistindo na obliteração completa das vias biliares extra-hepáticas. A AB, doença responsável pela maioria dos transplantes hepáticos infantis, tem uma etiologia pouco esclarecida. O conhecimento dos mecanismos responsáveis da doença possibilitaria o desenvolvimento de distintas opções terapêuticas disponíveis. Nosso grupo tem proposto que um possível distúrbio de natureza imune envolvendo a rede de vasos que nutre as estruturas biliares, o plexo vascular peribiliar (PVP), produza nos pacientes com AB uma colangiopatia isquêmica, causadora de uma colangite esclerosante secundária, progressiva. A expressão de VCAM-1 é utilizado como marcador do estado endotelial ativado, enquanto de PECAM-1 é usado como marcador do estado de repouso celular. **Objetivos:** Padronizar o protocolo de clareamento do ducto biliar para obter imagens confocal e padronizar as diluições dos marcadores primários PECAM-1 e CK 19. **Métodos:** Para a padronização do método, foram utilizados camundongos BALB/c adultos normais (n=2). Os mesmos foram anestesiados com isoflurano e decapitados. Após eutanásia, se procedeu a isolamento do ducto biliar. As amostras foram fixadas imediatamente com formaldeído. O protocolo de clareamento consistiu no tratamento das amostras com Fixador Dent's, reidratação com concentrações decrescentes de MeOH e posterior lavado com solução de PBS/BSA/TritonX. Finalmente se procedeu a dupla marcação com PECAM-1 e CK19 e após a marcação com Alexa 488 e Alexa 647 respectivamente. Foram testadas duas concentrações de anticorpos primários: 1:150 e 1:250. A concentração do anticorpo secundário foi de 1:250 segundo instruções do fabricante. **Resultados:** Na figura 1 podemos observar a marcação com as distintas diluições de CK19 e na figura 2 das diluições de PECAM-1. A melhor diluição para CK19 e PECAM-1 foi de 1:150 (fig. 1A e 2A). Ambas diluições se mostraram ótimas quando combinadas no momento da captura confocal (fig. 3). **Conclusão:** O protocolo de clareamento se mostrou eficaz para sua aplicação para microscopia confocal. A diluições de 1:150 testadas foram as indicadas para observar a estrutura do ducto biliar e seu PVP. O presente projeto foi aprovado pelo CEUA do HCPA sob o número 11-0190. **Palavras-chaves:** Atresia biliar, plexo vascular peribiliar, microscopia confocal. Projeto 11-0190