

**P 1255****Aplicação de protocolo de clareamento e marcação em ductos biliares de camundongos neonatos normais**

Amanda Pasqualotto; Carolina Uribe-Cruz; Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho; Themis Reverbel da Silveira; Jorge Luiz dos Santos - HCPA

**Introdução:** A atresia biliar (AB) consiste na obstrução dos ductos biliares (DB), é responsável pela maioria dos transplantes hepáticos infantis e sua etiologia é pouco esclarecida. Nosso grupo propõe que o plexo vascular peribiliar (PVP), que envolvem os DB, estejam comprometidos a um nível imunológico nos pacientes, resultando em uma esclerose progressiva desta via. O endotélio do PVP participa como regulador imune fino e um marcador do endotélio “ativado” é o VCAM-1, enquanto PECAM-1 é usado como marcador do estado de “repouso”. Assim, nossa hipótese é que em um modelo murino neonato de AB por Rotavírus Rhesus (RVR), o PVP apresentaria uma marcação positiva para VCAM-1 e nos animais normais o PVP expressaria PECAM-1. Para testar nossa hipótese, primeiramente, padronizamos os protocolos de clareamento e marcação (PECAM-1) dos DB em animais adultos normais, dado a facilidade de obtenção das amostras. Assim, uma vez padronizada as técnicas, é necessário avaliar estas em animais neonatos normais antes de serem testadas no modelo de AB por RVR. **Objetivo:** Avaliar os protocolos de clareamento e marcação do PVP em animais neonatos normais e quantificar a expressão de PECAM-1. **Métodos:** Foram utilizados camundongos BALB/C neonatos normais de 3, 5 e 7 dias (n= 2, 3 e 7 respectivamente). Após eutanásia, se procedeu ao isolamento dos DB que passaram pelo protocolo de clareamento, previamente padronizado (Fixador Dent's, MeOH PBS/BSA/TritonX). Logo, foram marcados com PECAM-1 e CK-19, um marcador para delinear o ducto biliar (1:150 em ambos). Como marcadores secundários fluorescentes foram utilizados Alexa 647 e 488 respectivamente (1:250). Foi realizada a quantificação da expressão do PECAM-1 pelo software FIJI-Image J. das imagens obtidas por microscopia confocal (uma imagem por DB). **Resultados:** Após protocolo de clareamento e marcação dos DB foi possível identificar o PVP marcado. A quantificação do PECAM-1 apresentou valores com um desvio muito grande e nosso tamanho amostral foi reduzido devido à perda de algumas amostras durante os procedimentos. **Conclusão:** O protocolo de clareamento e de marcação já padronizados mostrou-se eficaz em animais neonatos normais, podendo ser aplicados para obtenção de imagens por microscopia confocal e futuramente adotada no modelo de AB infectado por RVR. É necessário um aumento do tamanho amostral para realizar uma avaliação estatística do PECAM-1. Projeto aprovado pela CEUA 11-0190. Apoio financeiro: CNPQ, CAPES e FIPE. **Unitermos:** Atresia biliar; Microscopia confocal; Plexo vascular peribiliar