

500**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR A CONCENTRAÇÃO DE ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICA (AMPc) EM CÉLULAS HUMANAS DO SISTEMA IMUNE**

Letícia Baggio, Theresa L. Whiteside, Lucia Silla, Álvaro Laureano, Annelise Pezzi, Bruna Amorin, Felipe Rodrigues, Ianaê Wilke, Maria Aparecida Lima da Silva, Vanessa Valim. Hospital De Clínicas De Porto Alegre (HCPA).

Trabalho realizado durante o academic training no University of Pittsburgh Cancer Institute, onde a aluna, bolsista CAPES de Graduação sanduíche pelo Programa Ciência Sem Fronteiras (Processo número 8148/11-2), trabalhou como intern. Introdução: A adenosina monofosfato cíclica (AMPc) desempenha papel fundamental em vários processos intracelulares complexos e o envolvimento desta molécula com o efeito imunossupressor mediado por células T regulatórias (Tregs) sobre as células T convencionais (Tconv) tem sido relatado. Considerando-se a participação de células Treg em vários processos patológicos, tais como tumores e doenças autoimunes, é necessário investigar os mecanismos de vias de AMPc em células Treg e Tconv humanas. Objetivo: Padronizar metodologia para avaliar a concentração de AMPc em células sanguíneas humanas utilizando o teste HitHunter® cAMP II (DiscoverX). Metodologia: Bolsas de sangue foram obtidas do Banco de Sangue do University of Pittsburgh Medical Center e as células da camada mononuclear do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por separação por gradiente Ficoll-Paque (GE Healthcare). Avaliou-se o número ideal de PBMC a ser utilizado e a necessidade de ciclos de congelamento e descongelamento para obter a concentração de AMPc pelo teste a ser padronizado. Células T CD4+, T CD8+, Treg e Tconv foram isoladas utilizando-se kits específicos e avaliadas quanto à pureza por citometria de fluxo, sendo posteriormente incubadas overnight ou por até 48 h sob condições controladas e na presença ou não de rhIL-2. A concentração de AMPc foi então mensurada utilizando-se o teste HitHunter® cAMP II (DiscoverX) e as leituras realizadas em contador de luminescência TopCount NXT. Resultados: O número ideal de PBMC foi de 100.000 células por poço e constatou-se que não há necessidade de submeter as amostras a ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados do ensaio realizado com células T CD4+, T CD8+, Treg e Tconv não foram satisfatórios, pois um número maior de células é necessário. Considerações finais: O teste HitHunter® cAMP II (DiscoverX) requer uma grande quantidade de células T purificadas. Sendo o objetivo principal deste estudo avaliar a concentração de AMPc em células Treg, uma população rara do sangue periférico, um ensaio mais sensível deve ser considerado. Palavra-chave: adenosina monofosfato cíclica (AMPc); células T humanas; padronização de metodologia.