

III Congresso da Escola de Saúde e Medicina

II Workshop de Biotecnologia UCB: da bancada para a vida

Novembro de 2018

SELEÇÃO DE ANTIBIÓTICO MARCADOR PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA DA BACTÉRIA *PAENIBACILLUS ELGII* AC13

Gabriella Cavalcante Amorim: gabriella.cavalcante.am@gmail.com

Cristine Chaves Barreto: criscbarreto@gmail.com

Rosiane Andrade da Costa: rosianeac@gmail.com

Paenibacillus é um gênero bacteriano que tem sido muito pesquisado nos últimos anos devido a sua capacidade de produzir biomoléculas de interesse biotecnológico. *P. elgii* AC13, apresenta atividade antimicrobiana, produzindo peptídeos antimicrobianos por síntese não ribossomal. Esse mecanismo é muito versátil e produz uma gama de moléculas, que comumente apresentam elementos não encontrados em moléculas produzidas pela síntese ribossomal. Devido ao fato de *P. elgii* apresentar grande potencial biotecnológico, obter um maior conhecimento genético sobre ela, será importante para desenvolver processos biotecnológicos para produção de antimicrobianos desse microorganismo. E como ainda não se possui técnicas estabelecidas para a manipulação genética, o primeiro passo para isso é a seleção de antibióticos marcadores. O presente trabalho teve como objetivo identificar a suscetibilidade a antibióticos que podem ser utilizados como marcadores de transformação neste microorganismo, uma vez que esta bactéria é naturalmente resistente a vários antimicrobianos e pouco estudada. Para tanto, foram realizados ensaios de placa contendo meio de cultura adicionado com antibióticos (cloranfenicol, canamicina e ampicilina) em diferentes concentrações (10 µg/ml, 25 µg /ml, 50 µg /ml e 100 µg /ml). Em seguida, uma nova cultura de *P. elgii* foi inoculada e incubada a 37 ° C. As placas foram observadas com 24h, 48h e 72h para a presença e ausência de crescimento. Assim, observou-se que os antibióticos cloranfenicol e ampicilina foram eficazes na prevenção do crescimento em concentrações superiores a 25 µg / ml, enquanto o antibiótico canamicina não inibiu o crescimento em nenhuma das concentrações testadas. De acordo com os dados obtidos, o antibiótico canamicina é inviável para uso como antibiótico marcador, pois a bactéria *Paenibacillus elgii* apresentou resistência em todas as concentrações. Por outro lado, os antibióticos cloranfenicol e ampicilina, demonstraram o mesmo resultado e, portanto, possuem o mesmo potencial de uso do marcador antibiótico.

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PELGIPEPTINAS CAUSADA POR TRÊS AMINOÁCIDOS EM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO

Marise Leite Mendonça: marylmendonca93@gmail.com

Rosiane Andrade da Costa: rosianeac@gmail.com

Cristine Chaves Barreto: criscbarreto@gmail.com

A cepa de *Paenibacillus elgii* AC13 de solo do Cerrado produz Pelgipeptinas, lipopeptídeos produzidos por síntese não-ribossomal que demonstraram ação antimicrobiana. Este tipo de síntese envolve uma sintetase de peptídeos não ribossomais, complexos enzimáticos que incorporam aminoácidos formando o oligopeptídeo sem a necessidade de um mRNA e ribossomos. O objetivo desse estudo foi analisar e comparar a produção das Pelgipeptinas influenciada por aminoácidos. Foi selecionado um aminoácido que está presente na cadeia peptídica das Pelgipeptinas, a Valina, e dois aminoácidos que não estão presentes, Alanina e Ácido Aspártico. Os aminoácidos foram adicionados separadamente em uma concentração de 1g. L⁻¹ em meio quimicamente definido. Foi realizado o inóculo de 10³ esporos.mL⁻¹ de *Paenibacillus elgii* AC13 e incubado a 200 rpm em 37°C. Foram coletadas alíquotas a cada 24 horas até completar 96 horas. A biomassa foi estimada o método de peso seco e a fase do seu ciclo celular foi determinada por contagem direta. A concentração de Pelgipeptinas no sobrenadante foi determinada por RP-HPLC. O cultivo com Valina apresentou a maior produção entre os três cultivos com 125,08 µg.mL⁻¹ em 96 horas. Em comparação, os cultivos com Alanina e Ácido Aspártico obtiveram baixa produção de Pelgipeptinas. Os cultivos com Alanina e Valina apresentaram ciclo celular completo com esporulação completa das células havendo somente esporos livres, diferente do cultivo com Ácido Aspártico que não completou seu ciclo com 96 horas havendo presença de células vegetativas e de esporângios e a maior formação de biofilme, entre os três cultivos. O cultivo com Valina apresentou a maior produção de Pelgipeptinas e pouca formação de biofilme. Esse resultado indica que aminoácido adicionado no meio de cultivo pode influenciar na produção de Pelgipeptinas e na formação de biofilme. É possível que o aminoácido valina tenha sido diretamente incorporada em Pelgipeptinas causando uma maior produção da mesma.

TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM CÃES COM OSTEOARTROSE

Mauricio Antônio Silva Peixer: mauricio@labbiocell.com

Patricia Furtado Malard: patricia@labbiocell.com

Hilana dos Santos Sena Brunel: lanasena@gmail.com

Juliana Lott de Carvalho: julianalott@gmail.com

Robert Pogue: repogue@gmail.com

A osteoartrose é uma enfermidade causadora de dor e desconforto que vem se tornando cada vez mais presente na realidade de humanos e pequenos animais domésticos, especialmente os cães. As terapias atualmente disponíveis envolvem medicamentos para controle da dor e diminuição da inflamação, porém, os efeitos colaterais são consideráveis, impossibilitando a sua utilização por longos períodos. Ainda, há a possibilidade de realização de procedimentos cirúrgicos, porém, nem todos os pacientes são elegíveis para tais, sendo necessária a busca por novas possibilidades terapêuticas. Uma alternativa de terapia tem sido a aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs), as quais possuem a capacidade de regenerar tecido cartilaginoso e propriedades anti-inflamatórias, ideais para o reparo dos danos da osteoartrose. No presente estudo, foram utilizados 16 cães acometidos por osteoartrose, com intensidade de claudicação avaliada como intensa ou moderada. Esses animais receberam a aplicação intra-articular de 2 milhões de CTMs alogênicas em cada articulação acometida. Os indivíduos foram reavaliados 0, 30 e 180 dias após a aplicação de células e, dos 12 animais que tinham claudicação intensa, 5 passaram a claudicar moderadamente, 5 de forma leve e 2 pararam de claudicar. Dos 4 que claudicavam moderadamente antes da terapia, 1 passou a claudicar de forma leve e 3 tiveram remissão completa do grau de claudicação. Dessa forma após a terapia com CTMs, 75% dos pacientes do estudo apresentou completa remissão do caso, sem claudicação, e 25% conservou uma claudicação leve. Nenhum animal apresentou qualquer reação à aplicação das células. Esses resultados são promissores, considerando que, tanto na medicina veterinária quanto na humana, o protocolo para tratamento de casos de osteoartrose é a utilização de medicamentos para controle da dor, os quais não devem ser utilizados durante longos períodos, devido aos efeitos colaterais, e as intervenções cirúrgicas, as quais podem ser preocupantes em grupos de riscos.

TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CASO DE HIPOPLASIA DA MEDULA ÓSSEA DE CÃO

Mauricio Antônio Silva Peixer: mauricio@labbiocell.com

Patricia Furtado Malard: patricia@labbiocell.com

Hilana dos Santos Sena Brunel: lanasena@gmail.com

Juliana Lott de Carvalho: julianalott@gmail.com

Robert Pogue: repogue@gmail.com

A hipoplasia medular pode ser caracterizada pela diminuição na produção das linhagens celulares da medula óssea ou dos precursores eritróides, podendo ser causada por uma infinidade de agentes ou desordens. Ao realizar a aplicação endovenosa das células-tronco mesenquimais, os fatores de crescimento liberados por elas promovem a recuperação das séries sanguíneas, causando a quimioatração de células-tronco endógenas e aumentando a taxa de mitose de células progenitoras sanguíneas, culminando no repovoamento da medula óssea. Um cão SRD de 7 anos de idade diagnosticado com leishmaniose e sendo tratado há cerca de 6 meses, foi atendido no Hospital Veterinário Arca de Noé, em Brasília – DF por apresentar inapetência e apatia. Durante a avaliação clínica, o animal mostrou-se com dificuldade respiratória e mucosas hipocoradas, e, por meio de exames laboratoriais, e mielograma, o animal foi diagnosticado com hipoplasia medular grave da série eritrocítica, com parâmetro hematócrito em 16,2%. Foi, então, realizada a transfusão sanguínea e iniciou-se o tratamento com corticoterapia. Porém, após três semanas reiniciou-se a queda do hematócrito, chegando a 15,3% quatro semanas após a transfusão. Nesse momento optou-se por realizar a terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTMs). O paciente recebeu 3 aplicações de 5×10^6 CTMs por via endovenosa. No momento da 2ª aplicação o animal já não estava recebendo corticóides. A terapia celular provocou o aumento do seu hematócrito e o manteve estável em valores próximos de 28% por todo o período em que o animal foi acompanhado, 3 meses após a terapia celular.

**CONTROLE DE QUALIDADE NA FORMAÇÃO DE UM BIOBANCO DE CÉLULAS - TRONCO
MESENQUIMAIS PARA TERAPIA CELULAR**

Patricia Furtado Malard: patricia@labbiocell.com

Mauricio Antônio Silva Peixer: mauricio@labbiocell.com

Hilana dos Santos Sena Brunel: lanasena@gmail.com

Robert Pogue: repogue@gmail.com

Juliana Lott de Carvalho: julianalott@gmail.com

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMs) são uma fonte promissora para terapia celular autóloga e alogênica devido à sua capacidade de auto-renovação, diferenciação, modulação do estresse oxidativo, secreção de citocinas e fatores de crescimento. Assim, é fundamental realizar um eficiente controle de qualidade das células antes do seu uso em terapia. O objetivo do estudo foi caracterizar, avaliar a viabilidade celular e potencial de contaminação de CTMs obtidas de tecido adiposo de um cão, realizado pelo laboratório BioCell. Para isso, as células foram isoladas de tecido adiposo, cultivadas, envasadas em palhetas e congeladas em N₂. Para as avaliações de caracterização, foram descongeladas 2 palhetas e o material foi fixado em paraformaldeído 0.3%, tamponado com albumina sérica bovina (BSA) e analisado em citometria de fluxo com quantificador de imagem para o fenótipo dos antígenos de superfície CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺ e proteínas nucleares de indiferenciação celular SOX2 e OCT3/4. O resultado mostrou que os marcadores triplo positivos estavam presentes em 98,02% da amostra e marcadores nucleares SOX2 e OCT3.4 estiveram presentes em 83,98% e 93,15%, respectivamente. Ainda, as células foram cultivadas em meio específico para diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos e foram coradas, mostrando seu potencial de diferenciação nessas três linhagens celulares. Para a análise de viabilidade celular pós-descongelamento, as amostras criopreservadas foram descongeladas e armazenadas à temperatura ambiente em seringas com meio de transporte. As avaliações foram realizadas com corante azul de trypan 24 h após o descongelamento, sendo possível observar 84% de células viáveis. Por fim, amostras do meio de cultivo celular foram analisadas por PCR, mostrando resultados negativos para *mycoplasma sp.*, microbiológico e micológico. De acordo com esses resultados, que se mostraram satisfatórios, as células testadas podem ser armazenadas em biobanco para serem utilizadas em terapia celular.

POTENCIAL USO DO PEPTÍDEO *HOST DEFENSE* IDR-1018 NA REGENERAÇÃO DE PELE EM SISTEMA**HUMANO**

Thuany de Alencar e Silva - thuanyalencar@gmail.com

Lucas Pereira da Silva- lucas_silvapereir@yahoo.com.br

Mariana Carolina Braga- mmaricarol@gmail.com

Gustavo Oliveira Silva Santana - oliveira_gustavo_@hotmail.com

Rosangela Vieira de Andrade - rosangelavand@gmail.com

Simoni Campos Dias - si.camposdias@gmail.com

Octávio Luiz Franco - ocfranco@gmail.com

Juliana Lott de Carvalho - julianalott@gmail.com

Em situações de lesão da pele, há grande possibilidade de infecção e comprometimento do processo regenerativo, podendo evoluir para um processo cicatricial, com significativo prejuízo funcional. Os peptídeos *host defense* (HDPs) constituem nova estratégia de tratamento para auxiliar no processo regenerativo. Sendo assim, este trabalho objetivou estudar o potencial de aplicação do peptídeo IDR-1018 para a regeneração da pele em sistema 100% humano. Avaliou-se a citotoxicidade e proliferação de todas as linhagens celulares – Fibroblastos (Fibs), Queratinócitos (KCs) e Melanócitos (MeWo)- tratadas com IDR-1018 por meio de MTT. O comportamento migratório das células foi avaliado por método de *scratch*. O ensaio de contração de colágeno foi feito por medição da área do gel. A quantificação da produção de colágeno foi feita pela coloração com *sirius red*. A análise dos genes foi feita por PCR em tempo real. Ensaios em modelo de pele humano foram realizados, onde foi mimetizado lesões de pele. Os dados obtidos indicam que o IDR-1018 não comprometeu a viabilidade das linhagens celulares (98,82% Fibs $\pm 6,2$; 95,35% KCs $\pm 3,77$ e 95,23% $\pm 2,11$ MeWo). As células tiveram um aumento no comportamento migratório quando tratadas com IDR-1018 (Fibs -86,95 $\pm 1,1$ com 48h; KCs -103,01 $\pm 6,6$ com 48 h; MeWo -101,31 $\pm 4,68$ com 48 h). O ensaio de contração de colágeno demonstrou que os géis contendo o peptídeo contraíram (9,43%) praticamente da mesma forma que o controle negativo (9,2 %). A produção de colágeno foi maior em células tratadas com IDR-1018. A expressão de quimiorreceptores, fatores angiogênicos e regenerativos é aumentada quando as células são tratadas com IDR-1018. Quando testado para tratar lesão em modelo de pele, este peptídeo gerou aumento na espessura da nova epiderme (64 μm^2). Os resultados obtidos indicam potencial aplicação deste peptídeo no tratamento de lesões de pele para promover regeneração.

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM LINHAGENS CELULARES DE OSTEOSSARCOMA UTILIZANDO A IFOSFAMIDA

Maria Tereza de Oliveira Rodrigues - maariatereza@hotmail.com

Lucas Pereira da Silva - lucas_silvapereir@yahoo.com.br

Andrea Barreto Motoyama - andreabm@unb.br

Juliana Lott de Carvalho - julianalott@gmail.com

Robert Pogue - repogue@gmail.com

Rosângela Vieira de Andrade - rosangelavand@gmail.com

Osteossarcoma é um tumor ósseo caracterizado entre os tumores infanto-juvenis, com maior incidência durante o estirão de crescimento. O crescimento ósseo anormal, origina-se por exposição à radiação, doenças genéticas como a síndrome de Paget e mutações em genes supressores de tumores como o gene P53 e Rb. O tratamento é realizado a partir de uma quimioterapia neoadjuvante seguida da ressecção do tumor, dentre os fármacos mais utilizados está a ifosfamida que atua como agente alquilante. Um grande desafio enfrentado no decorrer do tratamento deste câncer parte da heterogeneidade tumoral, que incita alta capacidade metastática, e a resistência aos quimioterápicos ministrados no tratamento. O processo de indução de resistência a ifosfamida na linhagem U2OS de osteossarcoma humano foi realizado com objetivo de caracterizar e comparar as células sensíveis e resistentes ao fármaco. Este trabalho visa avaliar a susceptibilidade ou resistência de células sensíveis e resistentes a ifosfamida frente a outros fármacos comumente utilizados no tratamento do osteossarcoma, a doxorrubicina e a cisplatina. A linhagem celular U-2OS foi cultivada com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e estufa 5% de CO² a 37°C. As células foram submetidas a um protocolo de indução de resistência ao antineoplásico ifosfamida, comumente utilizado no tratamento de osteossarcoma, com algumas adaptações no processo descrito por Wang & Li, (2014). O teste de IC₅₀ com doxorrubicina aplicado as linhagens sensível e com resistência induzida à ifosfamida apresentaram diferença significativa com P value < 0,0001. Um dos grandes obstáculos no tratamento de osteossarcoma ocorrem devido a alta taxa de metástase e a resistência que estas células tumorais desenvolvem no decorrer da quimioterapia. Com base nestes dados é interessante o desenvolvimento de uma linhagem de osteossarcoma humano com resistência induzida para caracterização e comparação entre células sensíveis e resistentes para melhor compreensão dos mecanismos de resistência envolvidos nesta patologia.

CLONAGEM DE PRÓ-VETORES VIRAIS PARA A EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES CODIFICADORES DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NAS FOLHAS DE *Nicotiana benthamiana*

Victor Albuquerque Cunha – victor.alb05@gmail.com

Michel Lopes Leite - michelleitte@gmail.com

Lorena Sousa de Loiola Costa - loiola.lorena@gmail.com

Samanta Carvalho da Silva - samantac.biomed@gmail.com

Ariadne de Oliveira Licar - ariadnewallker@gmail.com

Cristiano Castro Lacorte - cristiano.lacorte@embrapa.br

Octávio Luiz Franco - ocfranco@gmail.com

Simoni Campos Dias - si.camposdias@gmail.com

Nicolau Brito da Cunha - nicolaubrt@gmail.com

Existe uma constante demanda por novos medicamentos antibióticos e antifúngicos, devido ao aumento de casos de cepas resistentes às drogas convencionais. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são candidatos promissores a serem usados como potenciais fármacos no combate a estes microrganismos. Nesse contexto, a produção em larga escala de PAMs é crucial para o seu emprego como medicamentos no controle de infecções. Porém, os PAMS não são biossintetizados naturalmente em quantidade suficiente para a sua purificação e produção num nível industrial/economicamente viável. Dessa forma, a expressão heteróloga de PAMs, utilizando-se pró-vetores virais, se mostra como uma alternativa promissora para obtê-los em larga escala e em curto tempo. O presente trabalho tem como objetivo a clonagem dos genes codificadores dos pró-vetores pICH31070, pICH14011, pICH20111 e pICH7410 em células de *Escherichia coli*. Estes pró-vetores serão utilizados posteriormente para a expressão transiente de PAMs em folhas de *Nicotiana benthamiana*. Os pró-vetores foram inseridos em células de *Escherichia coli* (XL-1Blue) por eletroporação. As colônias transformadas com os pró-vetores foram obtidas após o cultivo em meio LB sólido com o antibiótico de resistência de cada pró-vetor. Bactérias provenientes das colônias foram cultivadas em meio líquido com os antibióticos de resistência respectivos, por 12 horas, a 37°C. O DNA plasmidial dos clones foi obtido por minipreparação. A qualidade dos DNAs extraídos foi aferida por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e os clones corretos foram checados por clivagem com endonucleases de restrição. A partir de análises dos géis de eletroforese, foi possível verificar que a minipreparação dos pró-vetores e as digestões de checagem foram realizadas de forma eficaz, pois apresentaram o padrão de bandas de DNA esperados. A clonagem dos quatro pró-vetores de expressão foi realizada de forma satisfatória. No gel, é possível ver o padrão de bandas correto de cada pró-vetor referente a clivagem pelas endonucleases.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO PEPTÍDEO CUPIENINA 1A

Araújo, R. O – rayssa.oliveiraa@gmail.com

Costa, V. C. R. – veronica.cristine@hotmail.com

Leite, M. L. – michelleitte@gmail.com

Ferreira, A. C. R. – arthurcrf1@gmail.com

Silva, S. C. – samanta.biomed@gmail.com

Ramada, M. H. S. – marceloramada@gmail.com

Dias, S. C. – si.camposdias@gmail.com

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas presentes no sistema imune inato de vários organismos. Muitos PAMs podem ser encontrados em venenos animais, como aranhas, escorpiões e serpentes. O peptídeo cupienina 1a (Cu 1a) está presente na peçonha da aranha *Cupiennius salei*, e pertence a um grupo de peptídeos denominados cupieninas. Este peptídeo tem 35 resíduos de aminoácidos, e está propenso à formação de α -hélice. O peptídeo interage com membranas carregadas negativamente levando à lise celular eucariótica e procariótica, mostrando um interessante potencial biotecnológico. Portanto, este estudo teve como objetivo analisar as atividades, imunomoduladoras, antitumorais e antimicrobianas do peptídeo. Foram realizados ensaios antimicrobianos e ensaios de viabilidade celular para verificar as atividades biológicas da molécula. Inicialmente foi realizado o teste de susceptibilidade antimicrobiana, onde a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima foram determinadas contra estirpes multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Posteriormente foram realizados ensaios de viabilidade celular e produção de óxido nítrico induzido pelo peptídeo na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 para verificar a citotoxicidade e a possível imunomodulação pelo peptídeo na célula. Por fim, foram realizados ensaios de viabilidade celular contra a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma mamário. Os resultados obtidos demonstraram que o peptídeo Cu 1a inibiu as cepas bacterianas resistentes com sucesso. O peptídeo também apresentou atividade antitumoral contra células de adenocarcinoma mamário em baixas concentrações. No entanto, o peptídeo demonstrou alta citotoxicidade em relação aos macrófagos apesar da baixa produção de óxido nítrico induzida pelo peptídeo. Estes resultados levaram à uma projeção de sete novos análogos do peptídeo antimicrobiano Cu 1a, destinados a diminuir a atividade citotóxica observada sem perder as atividades antitumorais e antimicrobianas encontradas nesse estudo. Os análogos foram sintetizados e estão em processo de experimentação para detecção das suas respectivas atividades biológicas.

**INTERVALO DE ESTABILIDADE DE PELGIPEPTINAS PURIFICADAS PRODUZIDAS POR *PAENIBACILLUS ELGII*
CEPA AC13 FRENTE A DIFERENTES VALORES DE PH**

Isadora Emanoela Pereira Costa Andrade - iepcandrade@gmail.com

Gabriella Cavalcante Amorim - gabriella.cavalcante.am@gmail.com

Marise Leite Mendonça - marylmendonca93@gmail.com

Daniel Barros Ortega – ortegadnl@gmail.com

Rosiane Andrade da Costa – rosianeac@gmail.com

Cristine Chaves Barreto – criscbarreto@gmail.com

Pelgipeptinas são lipopetídeos cíclicos produzidos por *Paenibacillus elgii* que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias monodérmicas e didérmicas. Essas moléculas vêm despertando interesse devido ao seu potencial biotecnológico, sendo importante definir as condições nas quais podem ser usadas. Este estudo teve como objetivo determinar a estabilidade da atividade antimicrobiana dessas moléculas frente a alterações de pH. A cepa de *Paenibacillus elgii* AC13 foi cultivada (37°C; 200rpm; 72 horas) em Meio Mineral MMP (Patente #BR102017018881-7). As pelgipeptinas foram purificadas a partir do sobrenadantes de culturas isentas de células utilizando um cartucho C18 e quantificadas pelo método de Murphy. Em seguida, uma solução de pelgipeptina a 2.378,6µg/mL foi incubada por 12 horas à temperatura ambiente sob condições de pH de 2 a 12 (intervalos de 1,0 unidades de pH). A estabilidade foi avaliada por ensaio em ágar de disco-difusão usando pelgipeptinas neutralizadas. Os halos de inibição foram medidos antes e depois de cada tratamento e todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Possíveis alterações estruturais nas moléculas foram analisadas por espectrometria de massa MALDI ToF e RP-HPLC. O tamanho dos halos das pelgipeptinas geralmente variou de 9 a 13 mm. As amostras submetidas ao pH de 2 a 11 não apresentaram alterações estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nos halos quando comparados aos controles. No entanto, as pelgipeptinas tratadas com pH 12 não apresentaram zona de inibição, indicando perda de atividade antimicrobiana. Neste tratamento, também detectamos um aumento de 18 unidades de massa no espectro de massa das Pelgipeptinas usualmente atribuído à abertura do anel de lactona que caracteriza a linearização da molécula. Em conclusão, não houve alterações significativas na atividade antimicrobiana antes ou após os tratamentos com valores de pH, com exceção do pH 12, indicando que as Pelgipeptinas podem manter sua atividade mesmo quando submetidas a soluções muito ácidas.

MODELING OF A GENETIC DISEASE OF THE SKELETON USING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM

Bianca Simonassi Raso de Paiva - biancasimonassi@gmail.com

Mateus Marques Silva - mateus.31.27@outlook.com

Karla Kristine Freude - kkf@sund.ku.dk

Robert Pogue - repogue@gmail.com

Although important for the study of genetic diseases, *in vitro* models may depend on hard to access cell types. Chondrocytes are an example of such cells, and are the main cell type affected by the Nail Patella Syndrome (NPS), a skeletal genetic disease caused by mutations in the *LMX1B* gene. Instead of isolating cells from patients' tissues, an alternative method to obtain such cell types is through *in vitro* differentiation of stem cells, such as mesenchymal stem cells (MSCs) or induced pluripotent stem cells (iPSCs). As well as cell culture development, advances in gene editing technologies, such as the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 system, are relevant for disease modeling. The aim of this study is to apply the CRISPR/Cas9 technology in order to develop an *in vitro* model for NPS, through stem cell genome edition followed by chondrocyte differentiation. The methodology of the editing process consists, initially, in the design of a single-guide RNA (sgRNA), to serve as template for Cas9 nuclease activity, which is then transfected into the cells. In this study, transfection was performed through Lipofectamine™ (Thermo Fisher Scientific), a cationic lipid system, for MSCs and through Nucleofection (Nucleofector™, Amaxa), an electroporation method, for iPSCs. Following transfection is clone selection, a step that consists of colony picking and expansion. Next, PCR and sequencing of expanded cells detect edited clones, which are then further expanded in culture. With MSCs, transfection was successful at low rates, however, we did not proceed to clone selection and editing verification. Similarly, with iPSCs, transfection was successful at low rates, but we were able to proceed with colony picking, as well as expansion and sequencing of clones. Thus far, no edited clones were obtained. Nucleofection tests are continuing, and various programs will be tested in order to improve transfection efficiency.