

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE PÓS-GENÔMICA DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL MEDIADA
POR AMP_c DURANTE O CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi***

por
FABRICIO KLERYNTON MARCHINI

CURITIBA
MAIO/2004

FABRICIO KLERYNTON MARCHINI

**ANÁLISE PÓS-GENÔMICA DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL MEDIADO
POR AMPC DURANTE O CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi***

Dissertação de Mestrado Apresentada à
Coordenação do Curso de Pós-graduação em
Biologia Celular e Molecular da Universidade
Federal do Paraná.

Prof. Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

**CURITIBA
MAIO/2004**

A meus amados pais por tudo.

“Todos somos especies. O problema é que muitos de nós criam limites inexistentes e deixam de crescer. São sementes de grandes árvores plantadas em pequenos vasos... E nenhuma planta consegue crescer mais do que o vaso que a contém. Desenvolver-se implica em liberdade e responsabilidade.”

Roberto Lopes

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marco A. Krieger pela oportunidade, energia, otimismo e orientação demonstrados em momentos em que me deparava com a dificuldade do aprendizado.

Ao Dr. Stênio P. Fragoso pela sua boa vontade em ajudar espontaneamente.

Ao Dr. Samuel Goldenberg pela paciência com um estudante de pouco conhecimento e muitas vezes insistente.

Aos amigos que fiz no IBMP, os quais sempre me ajudaram. Lamento as muitas ocasiões em que fui ausente. Obrigado pela paciência e pelo companheirismo.

A minha irmã, meu afilhado Gabriel e meu amigo Marcelo pela amizade. E a Cris pelo carinho e paciência.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
OBJETIVOS	4
INTRODUÇÃO	5
CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS	7
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	9
SINALIZAÇÃO CELULAR EM <i>T. cruzi</i>	11
VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DO AMPc EM KINETOPLASTIDA	11
Adenilato Ciclases (AC)	11
Fosfodiesterases (PDE)	14
Proteína Quinase Dependente de AMPc (PKA)	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
INSUMOS E REAGENTES	16
MICROORGANISMOS	21
MEIOS DE CULTURA E TAMPÕES	21
OBTENÇÃO DAS FORMAS EVOLUTIVAS DO <i>T. cruzi in vitro</i>	29
ISOLAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
RNA total	31
RNA polissomal	31
DNA	33
“RANDOM PRIMER” ACOPLADA A REPRESENTAÇÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO (RP-RDE)	33
Síntese de DNA Complementar	35
Síntese da Segunda Fita	36

Hibridação e Amplificação Subtrativa	36
CLONAGEM MOLECULAR DOS “AMPLICONS” SELECIONADOS	38
Ligação dos Amplicons Alvo	38
Preparo de Células Competentes	39
Transformação e Seleção de Clones Recombinantes	39
Seleção de Clones Pelo Método de “Tooth-Pick”	40
Mini Preparação do Plasmídeo (“Mini Prep”)	40
Sequenciamento	41
“SOUTHERN-BLOT”	41
ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE)	42
Preparação de Blocos de Cromossomos (BERNARDS, 1986)	42
Condições Experimentais	42
“NORTHERN-BLOT”	43
ENSAIOS DE HIBRIDAÇÃO	43
BUSCA POR GENES CORRELACIONADOS (ANÁLISE <i>IN SILICO</i>)	44
OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	45
PCR EM TEMPO REAL	46
RESULTADOS	49
SELEÇÃO DE GENES COM EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL	49
ORGANIZAÇÃO GENÔMICA	53
BUSCA PELOS GENES INTEGRANTES DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DO AMP ^c	55
PCR EM TEMPO REAL	68
DISCUSSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
Anexo 1	99