

EDUARDO ROCHA

**PREVENÇÃO DE INFLAMAÇÃO E DE APOPTOSE
DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA
ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DO GENE *A1***

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do título de Doutor em
Medicina.

SÃO PAULO

2001

EDUARDO ROCHA

PREVENÇÃO DE INFLAMAÇÃO E DE APOPTOSE
DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA
ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DO GENE *AI*

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientadores: Prof. Dr. Alvaro Pacheco e Silva Filho (Brasil) e Prof. Dr. Christiane Ferran (EUA)

Coordenador: Prof. Dr. Alvaro Pacheco e Silva Filho.

SÃO PAULO

2001

Rocha, Eduardo.

Prevenção de inflamação e de apoptose de células endoteliais em cultura através da transferência do gene *A1*. / Eduardo Rocha--São Paulo, 2001.
?, ?f.

Tese (Doutor) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-graduação em Nefrologia

Título em inglês: *A1* gene transfer prevents inflammation and apoptosis in endothelial cell cultures.

1. Célula endotelial 2. Inflamação 3. Terapia genética
4. Apoptose 5. Domínio BH4 6. Gene *A1*

Trabalho realizado na Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina e no *Immunobiology Research Center, Harvard Medical School*, Boston, E.U.A. com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicada ao meu irmão Evandro.

“Antes de existir computador, existia enciclopédia,
antes de existir enciclopédia, existia alfabeto,
antes de existir alfabeto, existia a voz,
antes de existir a voz, existia o silêncio...”

Arnaldo Antunes (poeta brasileiro).

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

RESUMO	XII
SUMMARY	XIV
ABREVIATURAS	XVII
RELAÇÃO DE FIGURAS	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A CÉLULA ENDOTELIAL QUIESCENTE.....	2
1.2. ATIVACÃO DA CÉLULA ENDOTELIAL.....	3
1.3. PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF- κ B NO PROCESSO DE ATIVAÇÃO DA CÉLULA ENDOTELIAL.....	5
1.4. APOPTOSE E CÉLULA ENDOTELIAL.....	8
1.5. GENES PROTETORES.....	12
1.5.1. Bcl-2 e Bcl-x _L	12
1.5.2. A1.....	16
1.5.3. A20 e outros genes protetores.....	18
1.6. TRANSFERÊNCIA GENÉTICA SOMÁTICA.....	19
1.6.1. Transferência genética não-viral.....	20
1.6.2. Transferência genética mediada por vírus.....	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. CULTURAS CELULARES.....	28
3.1.1. Culturas de células endoteliais.....	28
3.1.2. Culturas de células 293.....	30
3.2. PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO.....	31
3.2.1. Plasmídeo pcDNA ₃ .HA-A1.....	33
3.2.2. Plasmídeo pAC.HA-A1.....	34
3.2.3. Plasmídeos mutantes de A1 (A1 Δ m).....	36

3.3.	PLASMÍDEOS REPÓRTERES.....	45
3.3.1.	Plasmídeo repórter NF- κ B-luciferase.....	45
3.3.2.	Plasmídeo repórter RSV β -galactosidase (RSV/ β -gal).....	46
3.4.	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	46
3.4.1.	Reação de amplificação com cadeia simples de DNA.....	46
3.4.2.	Purificação dos produtos de amplificação por PCR.....	47
3.4.3.	Sequenciamento genético automatizado.....	48
3.5.	TRANSFERÊNCIA GENÉTICA MEDIADA POR LIPOSSOMAS CATIÔNICOS.	48
3.5.1.	Protocolo experimental.....	48
3.5.2.	Indução de ativação de CE.....	50
3.5.3.	Indução de apoptose de CE.....	52
3.6.	ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	54
3.6.1.	Isolamento de proteínas.....	54
3.6.2.	Quantificação protéica.....	54
3.6.3.	<i>Immunoblotting</i>	55
3.7.	TRANSFERÊNCIA GENÉTICA MEDIADA POR ADENOVÍRUS.....	56
3.7.1.	Construção de adenovírus recombinante (Ad.A1 Δ TM).....	56
3.7.2.	Purificação e quantificação viral.....	59
3.7.3.	Infecção de CE com rAd.A1 Δ TM.....	62
3.7.4.	Imuno-histoquímica.....	63
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
4.	RESULTADOS	66
4.1.	ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE <i>A1</i> EM CE.....	67
4.1.1.	Expressão de proteína A1 e de proteínas recombinantes em CE.....	67
4.1.2.	Função anti-inflamatória do gene <i>A1</i> transferido para CE.....	68
4.1.3.	Função anti-apoptótica do gene <i>A1</i> transferido para CE.....	69
4.2.	ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENE <i>A1</i> EM CE.....	71
4.2.1.	Construção de mutantes do gene <i>A1</i> e expressão em CE.....	71

4.2.2. Papel do domínio BH4 na função anti-inflamatória de <i>A1</i> em CE.....	73
4.2.3. Papel do domínio BH4 na função anti-apoptótica de <i>A1</i> em CE.....	76
4.3. TRANSFERÊNCIA DO GENE <i>A1</i> , MEDIADA POR ADENOVÍRUS, PARA CE.	78
4.3.1. <i>Immunoblotting</i>	78
4.3.2. Imuno-histoquímica.....	79
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

RESUMO

Durante os processos de rejeição de alo e xenotransplantes, células endoteliais (CE) transformam-se e passam a apresentar características fenotípicas pro-inflamatórias e pró-trombóticas. Alguns membros da família de genes Bcl-2 (*bcl-2*, *bcl-x_L* e *A1*) exercem uma dupla função protetora em CE, ou seja, proteção contra apoptose e inflamação. Essa última função está diretamente ligada à inibição do fator de transcrição NF- κ B, que é fundamental para a indução dos principais genes pró-inflamatórios na CE: E-seletina, VCAM-1, IL-8, MCP-1, fator tecidual e PAI-1. Diferentemente de *bcl-2* e *Bcl-x_L*, o gene *A1* não expressa-se constitutivamente em CE, mas de forma induzida por mediadores pró-inflamatórios tais como LPS ou TNF. O gene *A1* codifica 3 domínios homólogos ao *bcl-2* (denominados BH1, BH2 e BH4) e não apresenta o domínio pró-apoptótico BH3. Membros da família de onco-proteínas Bcl-2 apresentam ainda um domínio carboxi-terminal transmembrana (TM), responsável pelo ancoramento das mesmas à membrana mitocondrial. Estudos prévios demonstraram que a função inibitória do fator NF- κ B pelo gene *bcl-2* relaciona-se ao domínio BH4 enquanto o papel do domínio TM com relação às funções protetoras exercidas por membros da família Bcl-2 em CE ainda não foi completamente estabelecido. Os objetivos principais deste estudo foram o de avaliar as funções protetoras (anti-apoptótica e anti-inflamatória) do gene *A1* transferido para CE; mapear as mesmas funções, correlacionando-as aos domínios BH4 e TM. A confirmação das funções protetoras do gene *A1* transferido para CE poderá abrir perspectivas para sua utilização futura na terapia genética de patologias onde a apoptose e inflamação de CE sejam observadas. Utilizando-se a técnica de amplificação por polimerase em cadeia (PCR) com *overlap extension* (OLE-PCR), deletamos o domínio BH4 do gene *A1* proveniente de

cDNA marcado com hemagutina (HA), usando "primers" específicos. Também por PCR, deletamos o domínio TM de *A1*. Após confirmação, por sequenciamento genético automatizado, das mutações dirigidas e amplificação por PCR, os produtos (*A1* Δ BH4 ou *A1*TM) foram inseridos em plasmídeos de expressão (pAC), sob controle de um promotor CMV. Da mesma forma, construímos um plasmídeo expressando uma sequência repetida (4X) do domínio BH4 de *A1* (polyA1BH4). Células aórticas bovinas (BAEC) em cultura foram co-transfectadas pela técnica de lipossomas não catiônicos, permitindo a transferência do gene *A1 wild type* ou de seus mutantes (*A1* Δ BH4 ou polyBH4), além dos genes repórteres luciferase-NF- κ B e β -galactosidase. A expressão proteica foi confirmada por *immunoblotting*, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HA. A deleção do domínio BH4 anulou ambas funções anti-inflamatória e anti-apoptótica do gene *A1* em CE. A expressão da proteína *A1* desprovida do domínio BH4 (*A1* Δ BH4) foi incapaz de inibir a indução do reporter NF- κ B por TNF, e não exerceu proteção das CE contra apoptose induzida por TNF-cicloheximida. A deleção do domínio TM não afetou as funções protetoras de *A1* nas CE estudadas. Entretanto, a expressão da proteína polyA1BH4 em BAEC reproduziu completamente a função anti-inflamatória da proteína *A1 wild-type*. Finalmente, construímos um adenovírus recombinante codificando o gene *A1* desprovido de domínio transmembrana (rAd.A1 Δ TM). O sucesso na transferência genética de *A1*, mediada por adenovírus, para as CE porcinas (PAEC) foi confirmado, através de *immunoblotting* e por imuno-histoquímica,, pela expressão da proteína transgênica *A1* em aproximadamente 100% de células infectadas. Esses resultados demonstram que a transferência do gene *A1* para CE é possível através da utilização de vetores virais e não-virais. Nosso estudo demonstra ainda que o domínio BH4, capaz de interagir em outros genes da família Bcl-2 com moléculas de sinalização como Ras, Raf-kinase e calcineurina,

é necessário e suficiente para a função anti-inflamatória, e necessário para a função anti-apoptótica, de A1, enquanto o domínio TM não é necessário para as mesmas funções em CE. A definição dos sítios de interação do domínio BH4 de *A1* com outras moléculas de sinalização poderá revelar novos candidatos potenciais para o tratamento farmacológico ou genético de doenças onde o processo de ativação e apoptose de CE estejam envolvidos, tais como a rejeição aguda ou crônica de alo e xenotransplantes.

SUMMARY

Acquisition by endothelial cells (EC) of a pro-inflammatory phenotype as well as apoptosis are common features of allo and xenograft rejection. It has been shown that the Bcl family members *bcl-2*, *bcl-x_L* and *A1* mediate a dual cytoprotective function in EC i.e. protection from apoptosis and prevention of inflammation. This latter function relates to the inhibition of the transcription factor NF- κ B that is required for the induction of most pro-inflammatory genes in EC such as E-selectin, VCAM-1, IL-8, MCP-1, Tissue Factor and PAI-1. Unlike *bcl-2* or *bcl-x_L*, *A1* is not constitutively expressed in EC but rather induced by pro-inflammatory mediators such as LPS or TNF α . The *A1* gene encodes 3 Bcl homology domains - BH1, BH2 and BH4 - but is devoid of the pro-apoptotic BH3 domain. Previous studies have shown that, in *bcl-2*, most of NF- κ B inhibitory function resides within the BH4 domain. The aim of this study was to map the protective anti-apoptotic and anti-inflammatory functions of *A1* in EC, considering the possibility of its use in gene therapy. The BH4 domain of HA-tagged human A1cDNA was deleted by overlap-extension PCR using 2 pairs of selected primers and its sequence confirmed (A1 Δ BH4). The PCR product was further cloned into the pAC expression plasmid under the control of the CMV promoter. Similar strategy was used to construct a "BH4-only" plasmid (polyA1BH4) consisting of a repetitive sequence (4X) of the BH4 domain of A1. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were co-transfected, using cationic liposome-mediated gene transfer, with A1 or A1 mutant expression plasmids (wild type A1, A1 Δ BH4 or polyBH4), a luciferase-NF- κ B reporter and a β -galactosidase reporter. Protein expression was demonstrated by western blot using an anti-HA MoAb. Deletion of the BH4 domain abrogated both the inhibitory effect of A1 upon NF- κ B activation and its anti-apoptotic function. Expression of A1 Δ BH4

in EC has neither inhibited LPS or TNF-mediated induction of the NF- κ B reporter nor cyclohexamide/TNF-mediated apoptosis. Expression of polyA1BH4 fully reproduced the anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of wild type A1. Finally, we have constructed a recombinant adenovirus coding for the A1 gene deleted from its transmembrane domain (rAd.A1 Δ TM). PAEC infected with rAd.A1 Δ TM have successfully expressed the A1 transgene protein in approximately 100% of cells. Our results indicate that A1 gene transfer to EC is feasible and can be achieved using viral and non-viral vectors. Our study shows that the BH4 domain of A1, which has been shown in other bcl genes to interact with molecules involved in signaling, such as Ras, Raf-kinase and calcineurin, is necessary and sufficient for the anti-inflammatory function of A1 in EC. Defining the targets of the BH4 domain of A1 in EC may reveal new potential therapeutic candidates in diseases where EC activation and apoptosis are involved, such as allo and xenograft rejection.

ABREVIATURAS

Ad5 – adenovírus tipo 5

BAEC – células endoteliais de aorta bovina

BH – domínio de homologia bcl-2

CE – célula(s) endotelial(is)

CMV – citomegalovírus

CO₂ – dióxido de carbono

CsCl – cloreto de célio

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

GM-CSF – fator de crescimento de granulócitos e macrófagos

h – hora

HA – hemaglutinina

HUVEC – células endoteliais de veias umbilicais humanas

LPS – lipopolissacarídeos

MCP – morte celular programada

MO – microscopia óptica

min. - minuto

NF- κ B – fator de transcrição nuclear *kappa B*

OLE-PCR – reação de polimerização em cadeia por *overlap extension*

PAEC – células endoteliais de aorta porcina

PBS – solução tamponada por fosfato

PCR – reação de polimerização em cadeia

PFU – unidades formadoras de placas

r.Ad.A1 Δ TM – adenovírus transgênico codificando o gene A1 desprovido do domínio transmembrana

r.Ad. β -gal – adenovírus transgênico codificando o gene da beta-galactosidase

TM – domínio transmembrana

TNF – fator de necrose tumoral alfa

URL – unidades relativas de luminescência

β -gal – beta-galactosidase

μ L – microlitro

μ M – micromolar

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS

A) FIGURAS

SEÇÃO 1 – INTRODUÇÃO

Figura 1 – A célula endotelial quiescente.

Figura 2 – A célula endotelial ativada.

Figura 3 – Ativação da célula endotelial. Papel do fator de transcrição NF- κ B.

Figura 4 – Ativação de inflamação e de apoptose a partir do TNFR1.

Figura 5 – Balanço entre vida e morte celular. Papel dos genes protetores constitutivos e induzíveis.

Figura 6 – A família de genes Bcl-2.

SEÇÃO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 7- Cultura de células endoteliais (PAEC). 40X.

Figura 8 – Células 293 em cultura (2º dia). 40X.

Figura 9 – Sequência do gene *A1* humano.

Figura 10 – Mapa do plasmídeo de expressão pcDNA₃.HA-A1.

Figura 11 – Mapa do plasmídeo de expressão pAC.CMV.PLPASR(+). Desenho à mão do próprio autor, Prof. Robert Gérard, da *University of Texas, Southwestern, TX, E.U.A.*

Figura 12 – Produto A1 Δ TM, após amplificação por PCR:. Eletroforese, gel de agarose a 2%.

Figura 13 – Seleção de clones positivos para HA-A1ΔTM, através de amplificação por PCR. Eletroforese em gel de agarose a 2%.

Figura 14 - Representação da reação de amplificação por *overlap extension* (OLE-PCR). Inicialmente reações independentes de amplificação (PCR Nº 1 e Nº 2) geram produtos (ab e cd), que compartilham de uma mesma sequência de bases. Numa terceira reação (PCR Nº 3) estes produtos interagem como *primers*, gerando o produto recombinante desejado.

Figura 15 - Etapas de amplificação por PCR para construção do plasmídeo pAC.HA-polyBH4

Figura 16 - Transferência genética mediada por lipossomas catiônicos.

Figura 17 - Cultura de células 293 no 4º dia pós-transfecção. Ausência de efeito citopático. 40X.

Figura 18 - Cultura de células 293 no 6º dia pós-transfecção. Efeito citopático inicial 40X.

Figura 19 - cultura de células 293 no 10º dia pós-transfecção. Efeito citopático completo 40X.

Figura 20 - Titulação viral em frascos de cultura (96 poços) de células 293. Dia 1 pós-inoculação. Ausência de efeito citopático. 40X.

Figura 21 - Titulação viral em frascos de cultura (96 poços) de células 293. Dia 4 pós-inoculação. Efeito citopático inicial. 40X.

Figura 22 - Titulação viral em frascos de cultura (96 poços) de células 293. Dia 5 pós-inoculação. Efeito citopático pleno. 40X.

SEÇÃO 4 - RESULTADOS

Figura 23 – Expressão de proteína A1 e mutantes (A1 Δ TM, A1polyBH4) em BAEC, 48 h após a transferência genética mediada por lipossomas catiônicos. NT= CE não transfectadas (controle negativo). *Immunoblotting*, eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%.

Figura 24 – Efeito da transferência do gene A1 sobre a ativação do repórter NF- κ B induzida por TNF (200 UI/ml) em BAEC. $P < 0,05$. **u.r.l.**= unidades relativas de luminescência.

Figura 25 – Efeito da transferência do gene A1 sobre a apoptose induzida por CHX/TNF em BAEC; $P < 0,05$.

Figura 26 – Expressão de proteína recombinante de mutantes do gene A1 (HA-A1 Δ m) em BAEC, 48 h após transferência genética mediada por lipossomas catiônicos. pAC=controle negativo; A1=gene A1 íntegro; A1 Δ TM=deleção do domínio TM; ; A1 Δ BH4=deleção do domínio BH4; polyBH4=sequência codificando o domínio BH4 (4X). *Immunoblotting*, eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%.

Figura 27 – Efeito da deleção dos domínios TM e BH4 da proteína A1 sobre a inibição da ativação do repórter NF- κ B em BAEC estimuladas por TNF (200 UI/ml); $P < 0,05$.

u.r.l.= unidades relativas de luminescência.

Figura 28 – Efeito da expressão isolada do domínio BH4 sobre a ativação do repórter NF- κ B em BAEC ativadas por TNF; $P < 0,05$. **u.r.l.**= unidades relativas de luminescência.

Figura 29 - Efeito da deleção dos domínios TM e BH4 sobre a função anti-apoptótica de A1 em BAEC tratadas com CHX (controle) ou CHX/TNF; $P < 0,05$ comparando-se os grupos pAC vs. A1 e pAC vs. Δ TM. $P = N.S.$ comparando-se os grupos pAC vs. A1 Δ BH4.

Figura 30 - Expressão de proteína HA-A1 Δ m em PAEC, 48 h após transferência genética mediada por adenovírus (rAd.A1 Δ TM). *Immunoblotting*; eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. Pfu = unidades formadoras de placas.

Figura 31 - Expressão de proteína HA-A1 Δ m em PAEC, 48 h após transferência genética mediada por adenovírus (rAd.A1 Δ TM). A) rAd. β -gal (controle); B) rAd.A1 Δ TM. Imuno-peroxidase. 40X.

SEÇÃO 5 – DISCUSSÃO

Figura 34 – Ativação do receptor de TNF do tipo 1 (TNF-R1) e vias de sinalização intracelular.

B) TABELAS

SEÇÃO 1 – INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Vetores virais mais utilizados para transferência genética.

SEÇÃO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2 – Etapas da amplificação do gene *A1* ou *A1ΔM* através da reação de polimerase em cadeia (PCR).

Tabela 3 – Etapas da amplificação com polimerase em cadeia (PCR) para sequenciamento genético.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A CÉLULA ENDOTELIAL QUIESCENTE

O endotélio vascular em seu estado de repouso caracteriza-se por apresentar um fenótipo com propriedades anti-inflamatórias e anti-coagulantes [COTRAN & POBER, 1989]. Estas propriedades estão diretamente ligadas à expressão constitutiva de genes tais como: heparano sulfato (HS), trombomodulina (TM), anexina V, ativador tecidual de plasminogênio (TPA), inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e às recentemente descritas ATPdases da célula endotelial (CD 39) [COTRAN & POBER, 1990; SÉVIGNY et al., 1997; ROBSON et al., 1997]. Em conjunto, as moléculas citadas são responsáveis pelas principais funções anti-inflamatórias e anti-coagulantes que caracterizam o fenótipo da célula endotelial quiescente (**Figura 1**).

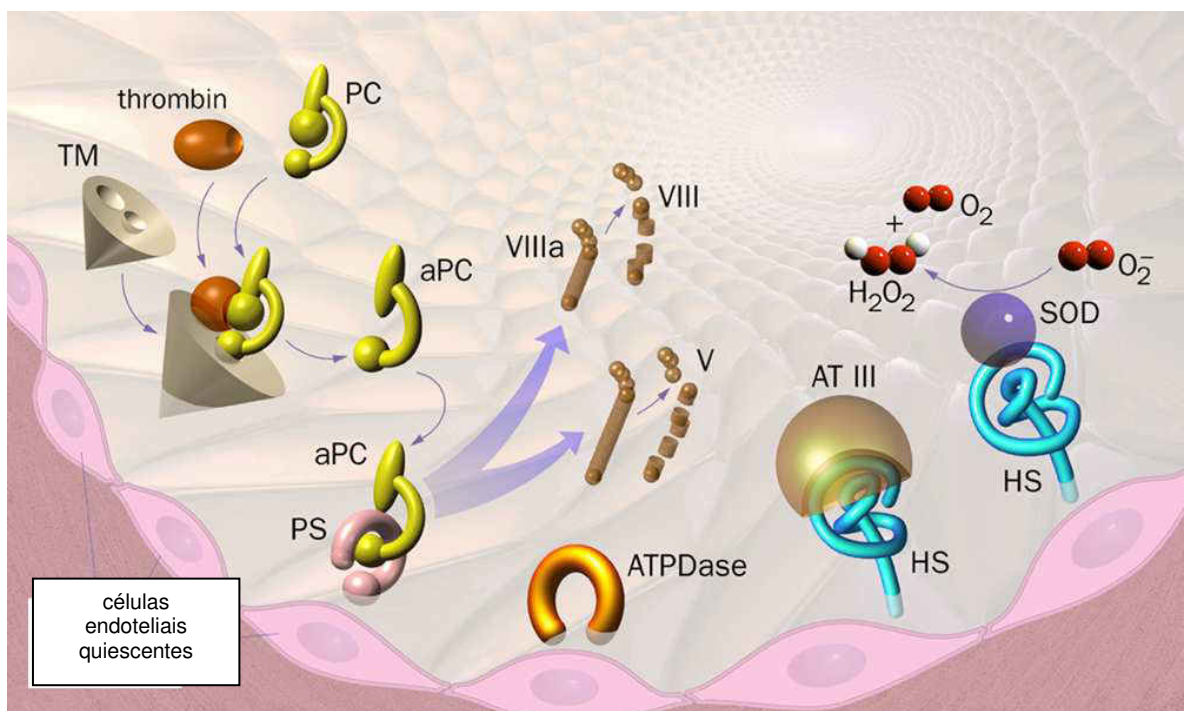


Figura 1 – A célula endotelial quiescente.

TM=trombomodulina, PC=proteína C, aPC=proteína C ativada, AT III=anti-trombina III,

SOD=superóxido dismutase, PS=proteína S, HS=heparano sulfato.

1.2. ATIVAÇÃO DA CÉLULA ENDOTELIAL

As células endoteliais modificam significativamente seu fenótipo quando submetidas a estímulos pró-inflamatórios, tais como $TNF\alpha$ e LPS *in vitro* ou *in vivo*, reproduzindo as condições observadas em locais de inflamação aguda ou crônica [GIMBRONE, 1995; POBER et al., 1990; FERRAN et al., 1993; BLAKELY et al., 1994]. Esta mudança fenotípica, à qual nos referimos como processo de ativação da célula endotelial (CE), é caracterizada pela transcrição de um número significativo de genes pró-inflamatórios e pró-coagulantes, tais como moléculas de adesão, citocinas e fator tecidual, além da perda de expressão na superfície celular das moléculas anticoagulantes supra-citadas [CONWAY & ROSENBERG, 1988; POBER & COTRAN, 1990, MANTOVANI et al., 1997], (**Figura 2**).

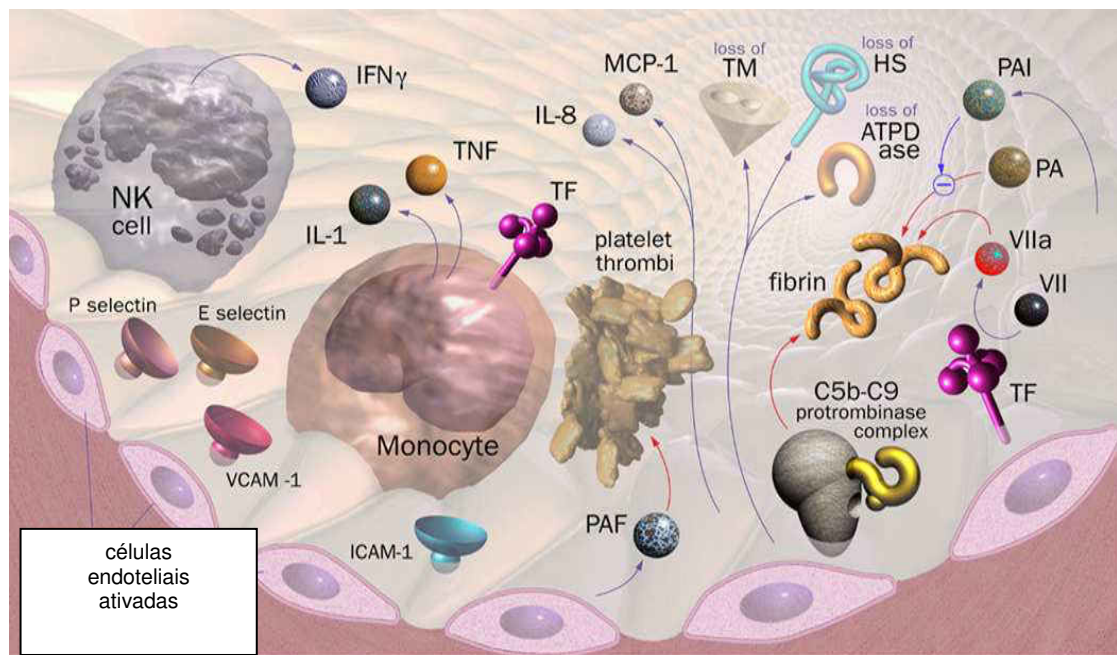


Figura 2 – A célula endotelial ativada.

TF=fator tecidual, PAF=fator de agregação plaquetária, PA=ativador de plasminogênio, PAI=inibidor do ativador do plasminogênio.

Curiosamente, embora os processos inflamatórios teciduais resultem em níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação de proteases, as CE são habitualmente resistentes à morte celular induzida por estes fatores [WARD, 1991; POLUNOVSKY, 1994; WANG et al., 1996]. Diversos autores têm abordado este problema, na tentativa de compreensão dos mecanismos que conferem proteção às CE durante a inflamação. Baseados em dados obtidos em experimentos *in vitro* e *in vivo*, Bach e cols. propuseram, utilizando um modelo de xenotransplante discordante, que a resistência das CE estaria associada à expressão pelas mesmas de genes protetores contra a morte celular programada, tais como os genes *A20*, heme-oxigenase-1 (*HO-1*), manganês-superóxido-dismutase (*MnSOD*) e dos genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 [BACH, HANCOCK, FERRAN, 1997; SATO et al., 2001].

Os mecanismos reguladores da expressão destes e de outros genes protetores nas CE ainda não foram completamente desvendados. De acordo com o nível atual de conhecimento, a resistência das CE à inflamação e à morte celular induzida por ativação não estaria explicada apenas pela expressão em níveis constitutivos de genes anti-apoptóticos, tais como *bcl-2* e *bcl-x_l* [BOISE et al., 1993; REED, 1994; CHAO et al., 1995]. Estudos prévios demonstraram que o nível de expressão destes genes na CE em repouso é normalmente baixo ou indetectável, mesmo após a estimulação destas células com citocinas pró-inflamatórias (LU et al., 1993). A descoberta de genes anti-apoptóticos indutíveis, tais como o *A1*, membro da família Bcl-2 [LIN, 1993; KARSAN, YEE, HARLAN, 1996], e da proteína *A20* [OPIPARI, BOGUSKI, DIXIT, 1990; OPIPARI et al., 1992; COOPER et al., 1996], abriu novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela resistência de CE à morte celular programada.

1.3. PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF- κ B NO PROCESSO DE ATIVAÇÃO DA CÉLULA ENDOTELIAL

Em vasos saudáveis, CE compõem a primeira barreira aos processos inflamatórios, previnem o ingresso de proteínas e de células imunológicas no parênquima celular e mantêm a parede vascular com características anti-trombóticas, evitando a ativação inadvertida do sistema de coagulação [ROSENBERG & ROSENBERG, 1984; BOMBELI, MUELLER, HAEBERLI, 1997]. Entretanto, na presença de condições pró-inflamatórias, tais como podemos detectar nas lesões de isquemia-reperfusão, sepse, vasculites, rejeição aguda e crônica de enxertos e rejeição retardada de xenotransplantes (DXR), ocorre a mudança fenotípica característica da ativação da CE. Nessas situações observa-se a perda da função de barreira celular pelas CE, levando à transudação de células inflamatórias e proteínas através dos vasos sanguíneos, resultando em edema, hemorragia e infiltração celular tecidual [ESMON, 1987; TOLLEFSEN, PESTKA, MONAFO, 1983; ZIMMERMAN, PRESCOTT, McINTYRE, 1992; JAFFE, 1994; BIANCHI et al. 1997].

Conforme citado anteriormente, do processo denominado de ativação da CE resulta a expressão aumentada de moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, que em conjunto favorecem os mecanismos de adesão, rolamento e migração entre leucócitos circulantes e CE característicos da inflamação, além de modificarem o meio, que passa a favorecer a trombose intra-vascular. Estudos voltados para a função das CE na inflamação permitiram a identificação de um grande número de genes induzidos por fatores pró-inflamatórios, dentre os quais destacamos as moléculas de adesão (E-seletina, VCAM-1, ICAM-1, P-seletina), as citocinas (IL-1, IL-6, e MCP-1), a quimiocina IL-8, moléculas pró-trombóticas, tais como o fator tecidual (FT) e o inibidor de

ativação do plasminogênio (PAI-1) [GERRITSEN & BLOOR, 1993; LEVIN & del ZOPPO, 1994; EMEIS et al., 1997, OSTERUD, 1997].

A regulação da expressão *de novo* dos genes supra-citados ocorre em nível de transcrição, de forma independente de síntese protéica. Nesse processo a participação de fatores de ativação pré-formados torna-se fundamental para a indução rápida dos genes pró-inflamatórios nas CE. A análise sequencial das regiões reguladoras dos genes induzidos durante o processo de ativação das CE revela que os genes supra-citados compartilham de pelo menos um elemento, i.e., um sítio de ligação para o fator de transcrição NF- κ B [LIOU & BALTIMORE, 1993]. Além disso, diferentes estudos demonstraram que o NF- κ B é essencial para a transcrição dos principais genes associados ao processo de ativação da CE [READ *et al.*, 1994; COLLINS et al., 1995; HAJRA *et al.*, 2000].

O NF- κ B é um fator de ativação de transcrição associado à expressão gênica rápida. A forma ativa, que se liga ao DNA, é um hetero-dímero composto por membros da família NF- κ B/Rel de fatores de transcrição, principalmente pelas subunidades NFKB1 (p50) e a RelA (p65). Nas CE em repouso o NF- κ B fica retido no citoplasma, associado à sua proteína inibidora I κ B α [BEG & BALDWIN, 1993; THANOS & MANIATIS, 1995]. Diferentes estímulos pró-inflamatórios levam à fosforilação e posterior ubiquinização do I κ B α citoplasmático, o que leva à destruição desta molécula no proteassoma, resultando na liberação do dímero de NF- κ B (p50/p65), que migra para o núcleo celular e inicia o processo de transcrição dos genes regulados por sítios de ligação - κ B [PALOMBELLA et al., 1994; WANG & BALDWIN, 1998], (**Figura 3**).

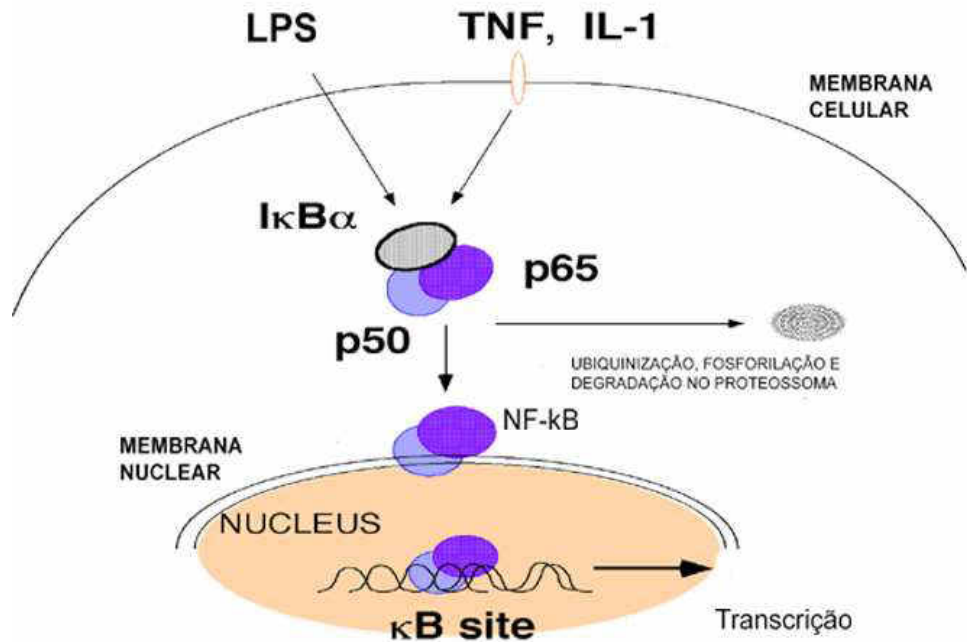


Figura 3 – Ativação da célula endotelial. Papel do fator de transcrição NF-κB

Estudos prévios demonstraram que o fator de transcrição NF-κB é um dos principais reguladores do processo de ativação da CE. A ativação do NF-κB e a degradação do IκBα podem ser inibidas por anti-oxidantes, sugerindo um papel importante das EROs como mediadores de ativação do NF-κB [WARD, 1991]. Estudos utilizando pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) demonstraram sua capacidade de inibição da ativação de CE, via inibição da ativação do NF-κB [FERRAN et al., 1995; LIU, YE, MALIK, 1999; AOKI et al., 2001]. No entanto, a ação pouco específica dos anti-oxidantes em geral permanece como principal fator limitante para sua utilização. Outras estratégias para inibição da ativação NF-κB em CE, tais

como a hiper-expressão do fator inibidor $I\kappa B\alpha$, têm sido tentadas sem grande êxito até o momento [WRIGHTON et al., 1996]. A principal dificuldade desta última abordagem foi a sensibilização das CE à apoptose mediada por TNF, o que evidenciou a necessidade de busca de novas estratégias na tentativa de inibição da ativação da CE.

1.4. APOPTOSE E CÉLULA ENDOTELIAL

Apoptose, ou morte celular programada (MCP), é uma forma geneticamente controlada de resposta que permite às células cometerem auto-destruição após estímulos específicos. Inicialmente descrita por KERR e cols. em 1972, a partir de observações morfológicas de microscopia óptica, a apoptose foi posteriormente caracterizada bioquimicamente pela ativação de endonucleases específicas (caspases), que clivam o DNA de dupla hélice nuclear em sítios precisos de exposição entre nucleossomas [KROEMER *et al.*, 1995; SUSIN *et al.*, 1997]. A fragmentação do DNA pode ser facilmente confirmada pela detecção do aspecto “em escada” em eletroforese do DNA em gel ou pela utilização de outras técnicas de marcação de fragmentos (TUNNEL ou citometria de fluxo). Outras alterações morfológicas características comumente observadas são a condensação da cromatina nuclear e o “blebbing” de membrana celular [KERR *et al.*, 1995; REED, 2000].

Novos conhecimentos vêm alimentando o campo da apoptose, a partir da identificação de moléculas reguladoras da MCP, classificadas entre inibidoras (inibidores da apoptose/IAP, Smac/DIABLO, proteínas da família Bcl-2), adaptadoras (Apaf-1) e efetoras (caspases) e da observação do fenômeno em situações diversas, fisiológicas ou patológicas [HUNOT & FLAVELL, 2001]. Dentre os

inúmeros processos onde a apoptose foi identificada, podemos destacar os relacionados à morfogênese e à seleção tímica onde a apoptose participa diretamente na destruição de células T auto-reagentes e conseqüente formação do perfil imunológico de cada indivíduo, além de ser uma forma comum de defesa contra agentes infecciosos virais e tumores [MA *et al.*, 1995].

Diversos reguladores da apoptose vêm sendo identificados e a relação funcional entre estes começa a ser desvendada. Observa-se certa variação em função do tipo celular estudado, porém a estrutura da máquina de morte celular programada apresenta grande semelhança entre espécies tão diferentes quanto o homem e o camundongo [EVAN & LITTLEWOOD, 1998, CHINNAIYAN *et al.*, 1997; NIWA *et al.*, 2000] .

A nível molecular foram identificados domínios de morte, responsáveis pela sinalização que inicia o processo de morte celular. Estes domínios da morte (FADD e TRADD) foram identificados em associação aos receptores de membrana celular da super família TNF (CD95/Fas e TNFR1, respectivamente) e a uma proteína de interação (RIP) com receptores de TNF [ROTHER *et al.*, 1994; ROTHER *et al.*, 1994; CHINNAIYAN *et al.*, 1995; HSU, XIONG, GOEDDEL, 1995; SUSIN *et al.*, 1997], **(Figura 4)**.

Outra família diretamente ligada ao processo de apoptose é a família das caspases (cisteína aspartato proteases). Estudos em invertebrados (*C. elegans*) e mamíferos demonstraram que a hiperexpressão da protease CED-3 (equivalente das caspases em humanos), da caspase-1 ou de outros membros da família, tais como a caspase-3 leva à MCP, o mesmo ocorrendo em mamíferos [CHINNAIYAN *et al.*, 1997; HENGARTNER, 1997; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 1998]. Até o momento já foram identificados cerca de 14 subtipos de caspases,

classificadas entre iniciadoras e efetoras da morte celular, de acordo com o nível de ativação em cascata [VAUX & KORSMEYER, 1999; KROEMER & REED, 2000]. A indução de apoptose pelas caspases pode ser regulada por membros da família Bcl-2, sendo inibida por alguns, tais como bcl-2 e bcl-x_L [VAUX, WEISSMAN, KIM, 1992; SHIMIZU et al., 1995; ADAMS & CORY, 1998], ou acelerada por outros, tais como BID, BAK, BAD e BAX [KIEFER et al., 1995; YANG et al., 1995; WANG et al., 1996; REED, 1997; ADAMS & CORY, 1998; WEI et al., 2001].

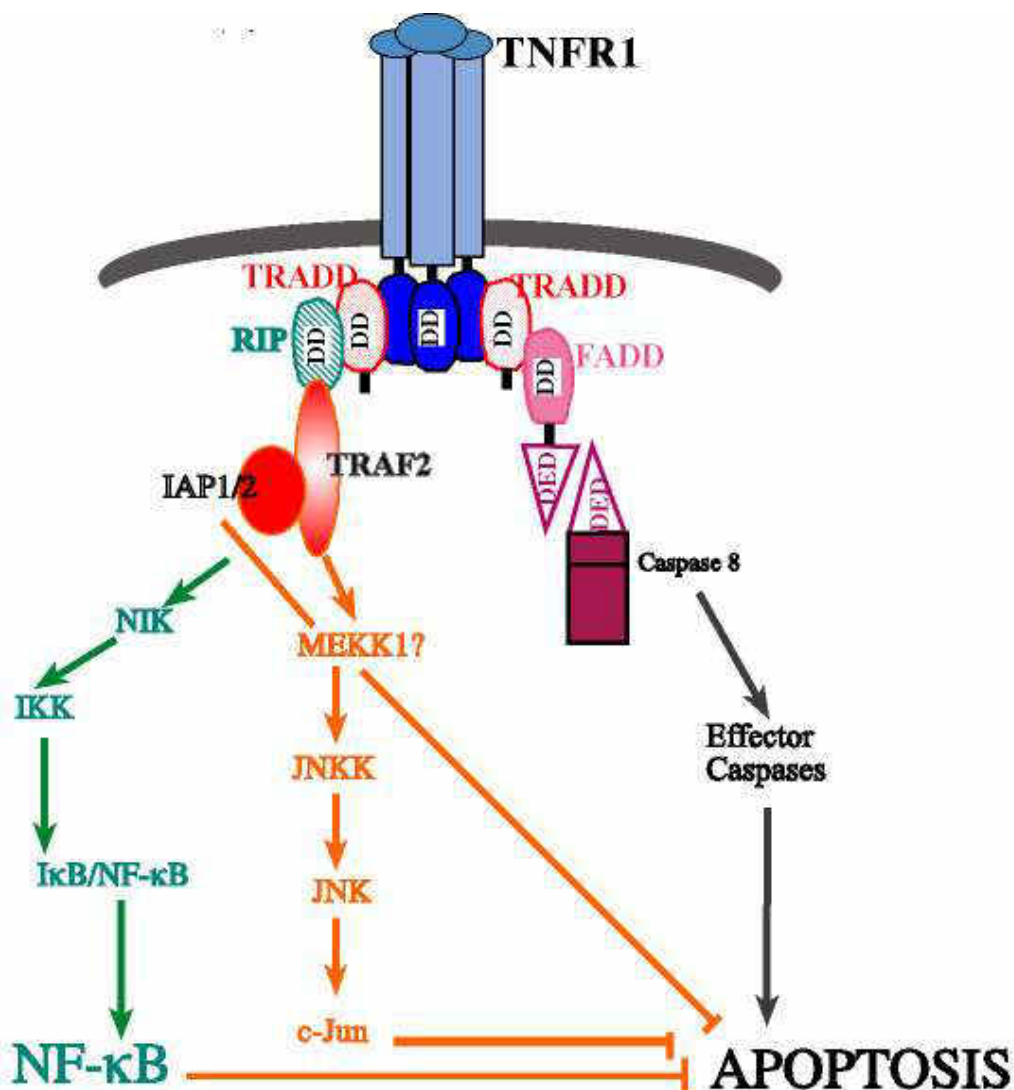


Figura 4 – Ativação de inflamação e de apoptose a partir do TNFR1.

Apesar do papel crucial exercido pelas caspases no processo de MCP, dados recentes sugerem que vias alternativas, independentes de caspase, podem levar à apoptose através da ativação, em nível mitocondrial, de um fator indutor de apoptose (AIF) [JOZA *et al.*, 2001]. Diferentes estímulos foram identificados como deflagradores de apoptose, tais como: privação de hormônios de crescimento, veneno de cobra, inibição de crescimento dependente de contato e estímulo com substâncias pró-inflamatórias tais como LPS, TNF ou EROs [ARAKI *et al.*, 1990; ARAKI *et al.*, 1993; ROBAYE *et al.*, 1991; POLUNOVSKY *et al.*, 1994; ABELLO *et al.*, 1994].

Embora possamos detectar apoptose em CE, geralmente estas células são resistentes à MCP [HOCKENBERY *et al.*, 1993]. Curiosamente, a superfície endotelial é constantemente exposta a fatores humorais, mediadores inflamatórios e a forças reológicas ("shear stress"). No geral, observa-se equilíbrio homeostático entre substâncias vasoativas, pró e anti-coagulantes, pró e anti-inflamatórias, promotores e inibidores de crescimento celular. Apenas quando ocorre um grande desequilíbrio entre estes processos observa-se apoptose das CE. Uma situação onde podemos constatar este fenômeno é a rejeição aguda e crônica de enxerto e, mais caracteristicamente, a rejeição retardada de xenotransplante que é caracterizada por ativação e apoptose das CE [BACH, HANCOCK, FERRAN, 1997; ROBSON, COOPER, d'ÁPICE, 2000], (**Figura 5**). Apesar de ainda não compreendermos adequadamente as bases moleculares da resistência de CE à apoptose, estudos recentes têm demonstrado o papel fundamental exercido pelos genes anti-apoptóticos na proteção deste tipo celular, com destaque para alguns membros da família Bcl-2, para o gene *A20* e para o gene da heme-oxigenase 1

(HO1) [JAATTELA *et al.* 1996; COOPER *et al.*, 1996; KROEMER, 1997; SATO *et al.*, 2001].

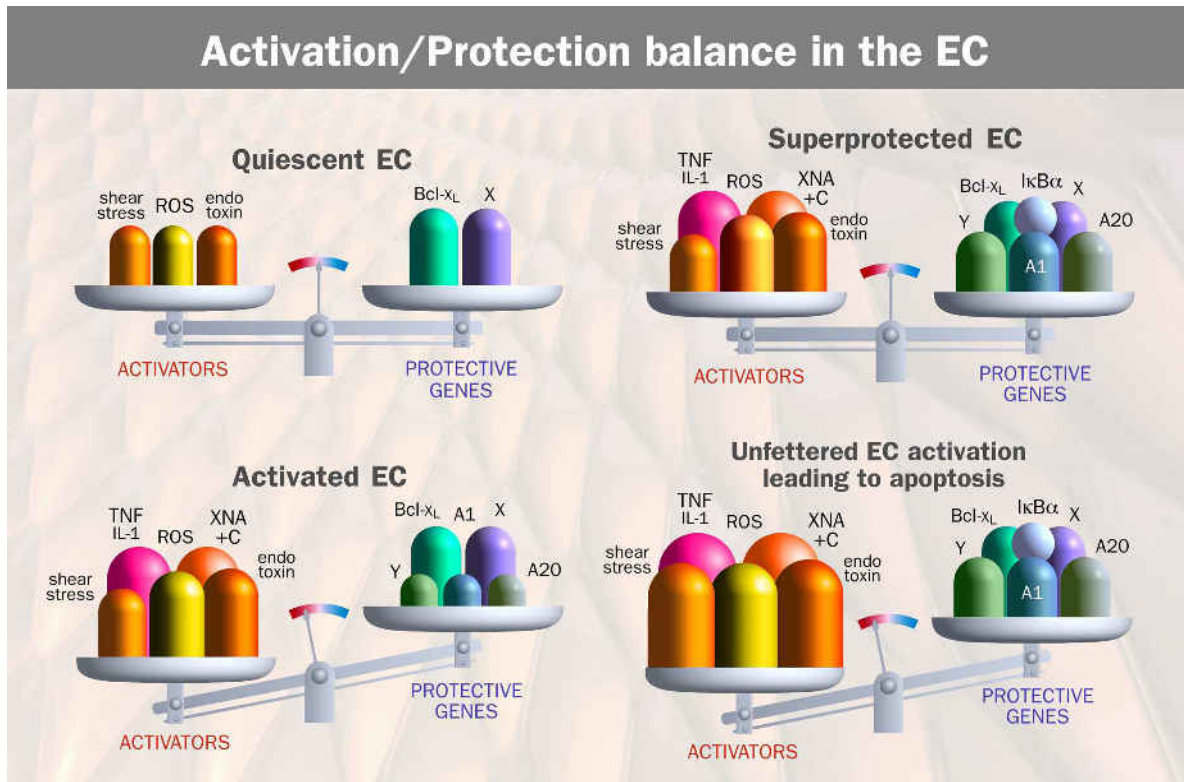


Figura 5 – Balanço entre a vida e a morte celular. Papel dos genes protetores constitutivos e induzíveis [BACH, HANCOCK, FERRAN, 1997].

1.5. GENES PROTETORES

1.5.1. Bcl-2 e Bcl-x_L

O gene *bcl-2* é o membro mais característico da família que leva o mesmo nome. Primeiro a ser identificado, o Bcl-2 é um proto-oncogene que diferencia-se dos demais oncogenes pela sua capacidade de inibição de morte celular programada e pela sua distribuição intra-celular (mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana

nuclear) [ZAMZAMI *et al.*, 1998]. O *bcl-2* foi clonado originalmente a partir de uma mutação [translocação t(14:18)] detectada em linfomas de linhagem B [BAKHSHI *et al.*, 1985; CLEARY *et al.*, 1986]. A proteína Bcl-2 possui um domínio transmembrana (TM) correspondente ao terminal carboxil ao qual associa-se a propriedade de ancoramento em membrana nuclear, mitocôndrias e retículo endoplasmático [KRAJEWSKI *et al.*, 1993; N'GUYEN *et al.*, 1994]. A remoção deste domínio TM previne o ancoramento a estas organelas sem, no entanto, afetar a função anti-apoptótica desta proteína [BORNER, 1994; BADRICHANI *et al.*, 1999]. *In vitro* e *in vivo*, a proteína Bcl-2 previne grande parte da morte celular induzida por: remoção de fatores de crescimento em células hematopoiéticas dependentes de IL-3, IL-4 ou fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF); corticosteróides, radiação ionizante, tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD3, hipoxia e hiperoxia [GREEN & REED, 1998]. Pouco se sabe sobre a função do gene *bcl-2* no endotélio vascular. Dados obtidos de estudos com imuno-histoquímica revelam que o endotélio vascular de fetos ou adultos expressam pouca proteína Bcl-2 [LeBRUN, WARNKE, CLEARY, 1993]. Entretanto, a expressão ectópica de Bcl-2 em células endoteliais aórticas murinas através de transferência genética por vetor retrovírus reduziu significativamente a morte celular induzida por privação de fator básico de fibroblastos (bFGF) [KARSAN *et al.*, 1997; ARAKI *et al.*, 1990]. Estes achados apontaram para o papel exercido pelo gene *bcl-2*, e outros membros da mesma família, na regulação fisiológica da vida e da morte de CE.

O gene *bcl-x* é um gene relacionado ao *bcl-2*, que atua regulando a vida e morte celular em diferentes tipos celulares. Os produtos da transcrição *bcl-x* alternam-se entre uma forma longa (*bcl-x_L*) e uma forma curta (*bcl-x_S*). A proteína resultante da transcrição *bcl-x_L* assemelha-se em grande parte à *bcl-2* em sua

potente ação anti-apoptótica [MUCHMORE *et al.*, 1996; SATTLER *et al.*, 1997; HU *et al.*, 1998]. Bcl-2 e Bcl-x_L são proteínas que dimerizam-se *in vivo* com diferentes membros da família Bcl-2. A hetero-dimerização com Bax, Bad and Bak, por exemplo, leva à perda da função anti-apoptótica de Bcl-2 e Bcl-x_L, que tornam-se pró-apoptóticas [YIN, OLTVAI, KORSMEYER, 1994]. Dados de literatura demonstram ainda que a proteína Bcl-2 também interage com os membros da família R-ras p23 ras e p21 ras assim como com a proteína quinase Raf-1 [FERNANDEZ-SARABIA & BISCHOFF, 1993; WANG, RAPP, REED, 1996]. Outros estudos demonstraram a interação entre a proteína Bcl-2 e a fosfatase calcineurina, ampliando o espectro de funções para aquela proteína [SHIBASAKI *et al.*, 1997]. A importância fisiológica destas interações ainda não foi estabelecida, porém sugere que as proteínas da família bcl-2 atuem interferindo com vias intra-celulares de sinalização. Com base com estagia atual do conhecimento, acredita-se que a interação entre protetores e indutores de morte celular defina a morte ou vida da célula, com o resultado final dependendo da proporção entre os diferentes membros da família. Essa relação, no entanto, nem sempre é respeitada, podendo ser observados resultados distintos, de acordo com o tipo celular estudado [ADAMS & CORY, 1998].

A análise estrutural dos membros da família Bcl-2 levou à identificação de 4 domínios de homologia com o gene *bcl-2*, denominados: BH1, BH2, BH3 e BH4. Estes domínios estão presentes em todos os membros da família Bcl-2, com variações de acordo com a função anti- ou pró-apoptótica de cada membro. A análise de estrutura/função dos diferentes domínios Bcl-2 demonstra que os domínios BH1 e BH2 são necessários para a homo e heterodimerização das proteínas Bcl-2, estando o domínio BH3 associado à função pró-apoptótica [YIN,

OLTVAI, KORSMEYER, 1994; CHITTENDEN *et al.*, 1995; KELEKAR & THOMPSON, 1998]. O domínio BH4 encontra-se presente apenas nos membros da família com propriedades anti-apoptóticas [HUANG, ADAMS, CORY, 1998], (**Figura 6**).

Uma análise mutacional da proteína Bcl-2 demonstrou que, além de sua função anti-apoptótica, os domínios BH são importantes para uma outra função, i.e., a inibição da ativação de CE através da inibição do fator de transcrição NF- κ B [BADRICHANI *et al.*, 1999].

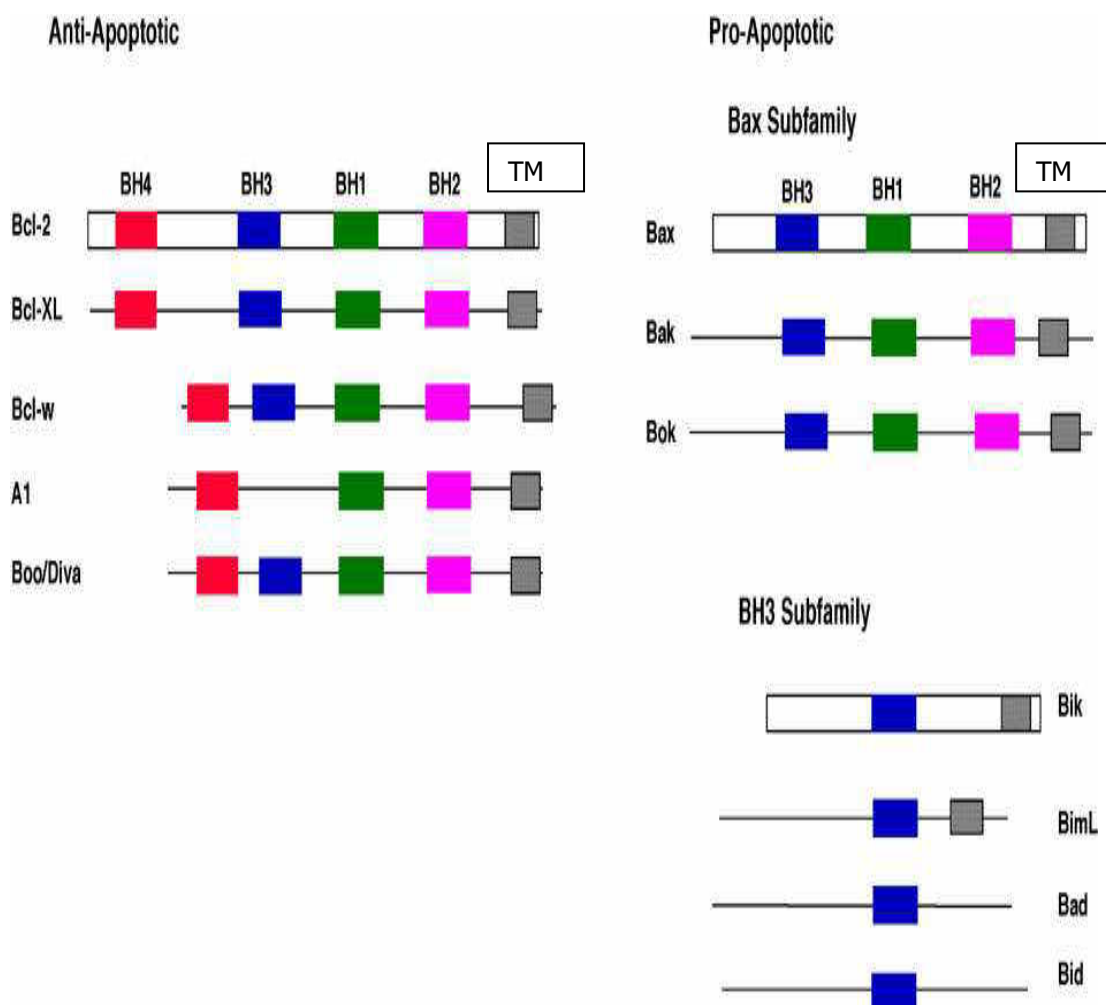


Figura 6 – A família de genes Bcl-2.

BH = domínios de homologia com o gene *bcl-2*; **TM** = domínio transmembrana.

1.5.2. A1

O gene *A1* é um membro anti-apoptótico da família Bcl-2, que foi originalmente identificado como gene de resposta rápida em linhagem hematopoiética após estimulação com GM-CSF [LIN *et al.*, 1993]. Estudos posteriores demonstraram a expressão do gene *A1* em outros tipos celulares, tais como linfócitos T e B, neutrófilos e CE [CARRIO *et al.*, 1996; D'SA-EIPPER, SUBRAMANIAN, CHINNADURAI, 1996; KARSAN, YEE, HARLAN, 1996]. Alta expressão de *A1* também foi identificada em tumores gástricos [CHOI *et al.*, 1995]. O gene também foi identificado em camundongos, sendo os homólogos nesta espécie classificados como *A1-a*, *A1-b*, *A1-c* e *A1-d*, tendo sido clonados a partir de uma biblioteca genômica murina e gerados por duplicação gênica [HATAKEYAMA *et al.*, 1998]. O mapeamento genético permitiu a localização do gene *A1* no cromossoma 9 murino e no cromossoma 15 humano [LIN *et al.*, 1997]

A expressão de *A1* em células T varia de acordo com as etapas de maturação intra-tímica. Ambos RNA mensageiro e proteína *A1* podem ser detectados em timócitos. A expressão de *A1* é detectável em células T duplamente negativas (CD4-CD8-), aumenta significativamente em células T duplamente positivas (CD4+CD8+) e volta a reduzir-se em células CD4+CD8- ou CD4-CD8+ antes de migrarem para a periferia. Linfócitos T circulantes maduros expressam níveis baixos (cerca de 25 vezes menos que os timócitos positivos) de *A1* [TOMAYKO *et al.*, 1999].

A expressão de *A1* em neutrófilos é constitutiva e indutível por G-CSF ou LPS [CHUANG *et al.*, 1998]. Atribui-se ao gene *A1* nos neutrófilos a função de proteger estas células contra apoptose. Camundongos no qual o subtipo *A1-a* encontrava-se ausente demonstraram apoptose acelerada de neutrófilos, principalmente após

estímulo com LPS, além de apoptose consequente à migração trans-endotelial [HAMASAKI *et al.*, 1998].

Em Linfócitos B a expressão de A1 é considerada necessária para a sobrevivência após estimulação CD40 e sinalização antigênica mediada por receptor [TOMAYKO & CANCRO, 1998; LEE, 1999; CRAXTON *et al.*, 2000].

Nas CE a transcrição de A1 é induzida por uma via de sinalização dependente de proteína quinase C (PKC) em resposta a diferentes estímulos pró-inflamatórios tais como TNF, LPS e IL-1, protegendo-as contra a apoptose induzida por ceramidas [KARSAN, YEE, HARLAN, 1996]. Estudos iniciais não demonstraram a expressão de *A1* em CE estimuladas por fatores de crescimento, porém Gerber *et al.* [1998], em estudo posterior, demonstraram que o gene *A1* poderia ser induzido, juntamente com o gene *bcl-2*, em CE privadas de soro, após estímulo com VEGF [GERBER, DIXIT, FERRARA, 1998].

Além da indução por mediadores inflamatórios, a expressão de A1 em monócitos pode ser induzida por via independente de TNF. Esta observação é importante, pois demonstra que em sítios de inflamação a interação entre as CE e monócitos facilita a resposta inflamatória enviando simultaneamente sinais que resultam na sobrevivência ambos tipos celulares [MILLAN *et al.*, 1997; NOBLE *et al.*, 1999].

É importante ressaltar que a ativação do fator de transcrição NF- κ B é necessária para a expressão de A1 em CE e outros tipos celulares [STROKA *et al.*, 1999; GRUMONT, ROURKE, GERONDAKIS, 1999; ZONG *et al.* 1999; LEE *et al.*, 1999]. Deste modo, após a degradação de I κ B α consequente à estimulação de CE com fatores pró-inflamatórios (TNF, LPS, IL-1) observa-se aumento da expressão de A1, demonstrando seu papel na alça de retro-alimentação negativa que visa à inibição da

ativação das CE. De forma inversa, a expressão aumentada de $I\kappa B\alpha$ pelas CE resulta na inibição da expressão de A1 [STROKA *et al.*, 1999].

1.5.3. A20 e outros genes protetores

O produto do gene *A20* é uma proteína que contém 7 dedos de Zn. Descrito originalmente como um gene de resposta rápida induzido por TNF em células de cordão umbilical humanas (HUVEC), a primeira função associada ao gene *A20* foi a de inibição da apoptose induzida por TNF em fibroblastos e linfócitos B. Posteriormente, seu papel na maturação linfocitária também foi identificado [OPIPARI Jr., BOGUSKI, DIXIT, 1990; SARMA *et al.*, 1995]. O mecanismo de ação da proteína A20 permanece, até o momento, desconhecido.

Ferran e cols. demonstraram que a proteína A20 exerce um duplo papel protetor em CE: proteção contra apoptose e inibição da ativação da CE através da inibição do fator de transcrição NF- κ B [COOPER *et al.*, 1996]. Desta forma, a expressão de A20 em CE inibe a apoptose induzida por TNF e cicloheximida, inibindo a degradação de $I\kappa B\alpha$ e, conseqüentemente, bloqueando a ativação de NF- κ B. Embora estudos que visaram a expressão acentuada de $I\kappa B\alpha$ tenham resultado em sensibilização das CE à apoptose induzida por TNF, na presença de expressão acentuada de A20 nas CE o efeito protetor deste gene predomina. Isto permite classificar o *A20* como gene protetor, sendo capaz de resgatar a CE das situações já descritas de apoptose induzida por TNF e abrindo grande perspectivas para aplicações terapêuticas futuras [BACH, HANCOCK, FERRAN, 1997].

Além dos genes anti-apoptóticos e do próprio gene $I\kappa B\alpha$, outros genes também podem exercer a função protetora de CE. Já foi demonstrado que o gene da ferritina,

ao ser induzido pelo heme, é capaz de proteger a CE contra a agressão causada por neutrófilos ativados [OBERLE *et al.*, 1999; BALLA *et al.*, 2000]. Da mesma forma, o gene da heme-oxigenase-1 (*HO-1*) tem sido associado à função protetora em monócitos e CE [WILLIS *et al.*, 1996].

Provavelmente, muitos genes protetores para a CE poderão ser identificados num futuro próximo. Esta hipótese baseia-se em experimentos de estimulação e proteção celular, tais como os realizados por Dalmaso e cols: Após a indução de ativação de CE com xenoanticorpos naturais (XNA) ou lectinas, células endoteliais de aorta de porco (PAEC) tornaram-se resistentes à lise provocada por complemento humano, sem que os mecanismos de resposta pudessem ser esclarecidos [DALMASSO *et al.*, 2000].

1.6. TRANSFERÊNCIA GENÉTICA SOMÁTICA

O endotélio vascular é a primeira barreira entre a circulação e os órgãos vascularizados e, portanto, apresenta-se como alvo preferencial de inúmeros estudos visando a transferência genética somática. No entanto, o DNA é um polímero hidrofílico que atravessa mal as membranas biológicas em geral. Diversos métodos de transferência genética somática foram desenvolvidos nos últimos anos e as técnicas atualmente estabelecidas utilizam vetores para facilitar a entrada de DNA (ou RNA) nas células-alvo. Podemos classificar as técnicas de transferência genética, de acordo com os vetores utilizados, entre métodos virais e não-virais de transferência [CRYSTAL, 1995; ANDERSON, 1998; KELLEY & SUKHATME, 1999].

1.6.1. Transferência genética não-viral

Diferentes técnicas não-virais de transferência genética somática vêm sendo estabelecidas nos últimos anos. Dentre elas, destacamos a técnica de transferência genética mediada por lipossomas catiônicos, devido à sua ampla aplicação em pesquisa experimental [CHAN *et al.*, 1987]. A técnica, que é descrita em maior detalhe na seção de **material e métodos**, consiste na mistura do DNA a ser inserido na célula – que apresenta naturalmente carga elétrica negativa – com lipídeos carregados com carga positiva. Da adsorção entre as moléculas resulta um composto lipossolúvel (complexo lipossoma/DNA), capaz de atravessar facilmente a membrana celular e carrear consigo o(s) gene(s) desejado, geralmente inserido em plasmídeos. Uma vez introduzido no citoplasma celular, a transcrição gênica pode ser iniciada. Diversos vetores de expressão encontram-se disponíveis comercialmente para esta finalidade. O método é de execução relativamente simples e apresenta numerosas vantagens quando comparado com outras técnicas não-virais de transferência genética, tais como co-precipitação de DNA com cálcio e fósforo, transferência mediada por carga elétrica ou por métodos mecânicos, tais como microinjeções ou liberação balística de partículas de DNA [TONEGUZZO, HAYDAY, KEATING, 1986; GORDON *et al.*, 1980; WILLIAMS, 1991]. As transfecções mediadas por lipossomas catiônicos podem ser executadas de forma rápida, não necessitam de equipamento especializado, pode ser realizada em qualquer laboratório equipado para culturas de células e resulta em níveis elevados de expressão gênica, dependendo do tipo celular estudado [CRYSTAL, 1995]. Alguns inconvenientes, no entanto, existem e relacionam-se principalmente: à pequena quantidade de DNA que pode ser transferido por procedimento, a uma certa toxicidade dos lipossomas sobre as células expostas e à expressão proteica limitada a um

percentual de células, variável, de acordo com o tipo celular. A transferência genética mediada por lipossomas catiônicos também é bastante reduzida em células em repouso, o que limita o método a uma janela temporal estreita durante o crescimento das células em cultura: as transfecções são otimizadas quando as células atingem um determinado grau de confluência. Embora menos eficaz que as técnicas virais de transferência, a utilização de lipossomas catiônicos resultou em níveis adequados de expressão transgênica em diferentes estudos, podendo também ser considerada para estudos de transferência genética *in vivo* e *ex vivo* [ANDERSON, 1998].

1.6.2. Transferência genética mediada por vírus

1.6.2.1. Aspectos gerais

Com o avanço das técnicas de biologia molecular pode-se estimar que em breve será possível modificar o endotélio vascular através da inserção ou deleção de genes específicos. Para atingir o primeiro já é possível a utilização da transferência genética mediada por vetores virais. A técnica consiste no aproveitamento do maquinário viral que durante séculos de evolução especializou-se na inserção de DNA (ou RNA) em células eucarióticas. A deleção de sequências específicas virais permite que os mesmos se tornem deficientes de replicação. Os principais vetores virais recombinantes atualmente em uso são o adenovírus (Ad), o vírus adeno-associado (AAV) o retrovírus e os destes derivados lentiviruses [ANDERSON, 1998; XIAO *et al.*, 1999; KELLEY & SUKHATME, 1999]. Para a transfecção de CE é preferível a utilização de Ad, lentivirus ou AAV já que estes podem infectar células em repouso e atingir níveis elevados de expressão transgênica em diversos tipos celulares. Após infecção com Ad ou

lentiviruses observa-se a expressão do transgene em praticamente todas as células em cultura, desde que uma quantidade adequada do vetor seja utilizada. A utilização de AAV para transfecção de CE é menos evidente, já que em geral é necessária a utilização de outro vírus (geralmente Ad) para facilitar o processo de transferência [ANDERSON, 1998].

Ad é o vetor viral mais utilizado atualmente para transfecção de CE *in vitro* ou *in vivo*, embora os vetores atualmente em uso ainda não estejam otimizados para uso clínico. As principais características dos diferentes vetores virais atualmente utilizados para transferência genética somática estão resumidas na **tabela 1**.

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Integra-se ao genoma; Infecta grande variedade de hospedeiros.	Integração anárquica ao genoma; Limitada a células em divisão.
Lentivírus	Integra-se ao genoma; Infecta grande variedade de hospedeiros.	Integração anárquica ao genoma; Contém sequências de HIV (risco potencial de infecção).
AAV	Integra-se ao genoma; Infecta grande variedade de hospedeiros.	Baixa eficácia; Induz resposta imune.
Adenovírus	Infecta células quiescentes (em repouso).	Não integra-se ao genoma; Perda de expressão com tempo; Induz resposta imune.

Tabela 1 – Vetores virais mais utilizados para transferência genética.

1.6.2.2. Transferência genética mediada por adenovírus

O adenovírus é um vírus de 36 kb de dupla hélice de DNA. A utilização de adenovírus recombinantes (rAd) como vetor de transferência permite a introdução eficaz de transgenes de até 7,5 kb de extensão em células primárias ou transformadas em cultura. Uma das grandes vantagens da utilização de rAd consiste na propriedade destes vírus de transfectar células fora da fase de divisão celular (em repouso) [GERARD & MEIDELL, 1993]. Geralmente a transfecção resulta em níveis elevados do transgene [CRYSTAL, 1995, ANDERSON, 1998]. Do ponto de vista de segurança, vacinas utilizando vírus vivo (replicantes) têm sido utilizadas há anos em milhões de seres humanos. O vírus íntegro (*wild type*) causa lise celular após sua replicação, o que pode ser evitado através da deleção da região E1, um domínio transativador do vírus necessário para os promotores dos genes de resposta rápida presente no restante do genoma viral [McGRORY, BAUTISTA, GRAHAM, 1988]. Os Ad disponíveis atualmente para transferência genética retêm aproximadamente 81% do genoma viral original. A manipulação direta do genoma do Ad é dificultada pela ausência de sítios de restrição únicos. Por este motivo, a maioria dos sistemas de construção da rAd utiliza fragmentos complementares de DNA para a produção do vetor recombinante. Uma das técnicas mais utilizadas para a construção de rAd é a do sistema de recombinação com o plasmídeo pJM17, que é descrita em maior detalhe na seção **material e métodos**. Com o objetivo de reduzir a probabilidade de geração de um vírus tipo *wild type* a partir de um plasmídeo contendo o genoma do Ad, o pJM17 tem uma sequência inserida na região correspondente ao domínio E1 que torna a molécula de DNA grande demais para inserção no envelope viral [GRAHAM & PREVEC, 1991]. O plasmídeo

complementar (pAC) contém o gene a ser inserido, que juntamente com seu promotor *enhancer* CMV e uma sequência de poli-adenilação SV40 formam a **cassete de expressão** a ser inserida na célula. Outras regiões correspondentes à sequência genômica terminal esquerda invertida do Ad 5 e a uma região sequencial à região E1 completam o plasmídeo. Os plasmídeos (pAC e PJM17) são co-transfectados em linhagens celulares derivadas de células embriônicas renais (células 293) que contém os produtos derivados da região E1 em *trans*, o que permite a recombinação *in vivo* dos plasmídeos e a geração do vírus recombinante (rAd). A produção de altos títulos de rAd é obtida em culturas de células 293 seguida de etapas de purificação e ultracentrifugação com cloreto de cério [McGRORY, BAUTISTA, GRAHAM, 1988; GRAHAM & PREVEC, 1991].

Para o propósito deste estudo, optamos por construir um vetor adenovírus recombinante contendo o gene *A1*, conforme descrito na seção **material e métodos**.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a possibilidade de transferência do gene *A1* para CE, mediada por vetores virais e não-virais;
 2. Analisar as funções protetoras, anti-apoptótica e anti-inflamatória, do gene *A1* transferido para CE por método não-viral de transferência;
 3. Estabelecer uma correlação entre os domínios BH4 e transmembrana do gene *A1* e as funções protetoras supra-citadas;
 4. Identificar uma sequência ou domínio mínimo, capaz de reproduzir a função anti-inflamatória do gene *A1* em CE;
 5. Construir um vetor viral, capaz de transferir o gene *A1* de forma adequada para aproximadamente 100% de CE expostas.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados nos laboratórios de pesquisa do *Immunobiology Research Center, Beth-Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School*, E.U.A., sob a supervisão direta da Prof^ª. Christiane Ferran, MD, PhD, de acordo com as normas de bioética e segurança da instituição.

3.1. CULTURAS CELULARES

Para a realização dos experimentos *in vitro* foram utilizadas culturas de células endoteliais primárias, provenientes de artérias aortas bovinas (BAEC) ou porcinas (PAEC). Para a geração e replicação de adenovírus recombinante (rAd) utilizamos uma linhagem celular denominada 293, modificada a partir células embrionárias renais.

3.1.1. Culturas de células endoteliais

Células endoteliais para culturas primárias foram obtidas em condições de esterilidade, de 1 a 2 horas após o sacrifício de vacas (BAEC) ou porcos (PAEC) jovens de até 2 anos de idade. As aortas dos animais foram colocadas em solução salina estéril e transportadas para o laboratório onde, sob capela de fluxo laminar, foram cortadas longitudinalmente e lavadas com solução de PBS estéril a 37°C. A seguir foram banhadas por 10 min com solução a 0,125% de colagenase tipo IA (Sigma-Aldrich, Co., Irvine, UK) aquecida a 37°C. A remoção das CE foi realizada através da raspagem suave da superfície interna das aortas dos animais, utilizando-se bastonetes de madeira estéreis (Fischer

Scientific, PA, E.U.A.), e coletadas em frascos de cultura de 24 poços (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca) pré-condicionados com solução a 0,2% de gelatina (Sigma-Aldrich, Co., Irvine, UK). Utilizamos meio de cultura DMEM adicionado de soro fetal bovino (SFB) a 10 % com 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA).

Após um período de incubação de 72 h a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂, pudemos observar à m.o. o início de crescimento de monocamadas de CE aderidas ao fundo de alguns poços, que foram então selecionados para repique. Nesse momento, procedeu-se à renovação do meio de cultura, após a lavagem dos poços com 1X PBS. Realizamos a observação diária dos poços à m.o., até que houvesse detecção de um nível de confluência de aproximadamente 90% e observássemos o aspecto morfológico característico (**Figura 7**). Nesse ponto as células foram submetidas a lavagem com 1 ml de 1X PBS a 4°C e extraídas dos poços de cultura, após tratamento com 200 µl de trypsin-EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) durante 2 min. Em seguida, as CE foram re-suspensas em 3 ml de meio de cultura e transferidas para poços de cultura maiores (30 mm³), pré-condicionados com gelatina 0,2%. O procedimento foi repetido de forma semelhante para a propagação de BAEC e PAEC. Os experimentos foram realizados entre a 4^a e 6^a passagens.

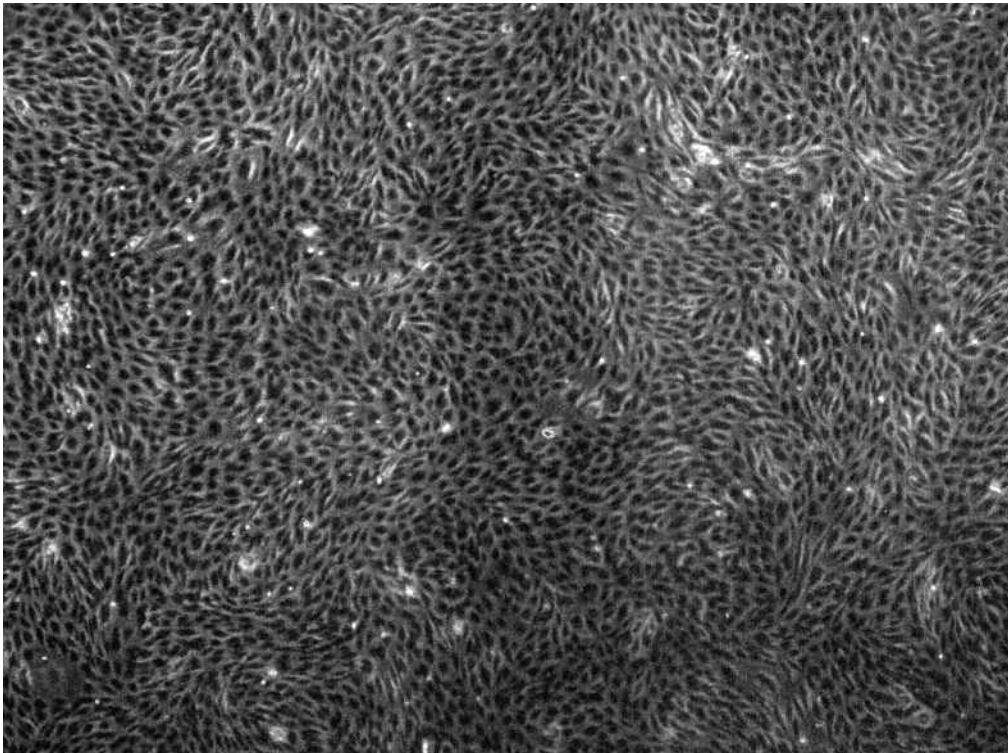


Figura 7- Cultura de células endoteliais (PAEC). 40X.

3.1.2. Culturas de células 293

Células embrionárias renais transformadas (células 293) foram compradas da *American Type Culture Collection* (A.T.C.C., Manassas, VA, E.U.A). Essas células são células primárias tubulares renais, transformadas pelo adenovírus tipo 5 (Ad5), que tem sido frequentemente utilizadas para a construção de vetores virais [GRAHAM & PREVEC, 1991]. As células foram manipuladas em um laboratório com nível 2 de bio-segurança, seguindo as normas estabelecidas pelo governo norte-americano, de acordo com o *U.S. Department of Health and Human Services* [1993]. Frascos contendo as células congeladas foram retirados do nitrogênio líquido, imediatamente imersos em banho-maria a 37°C e, logo após, transferidos para frascos de cultura estéreis (Nalge Nunc

International, Roskilde, Dinamarca) com superfície de 75 cm², pré-condicionados com gelatina a 0,2%, contendo 30 ml de DMEM, adicionado de SFB a 10%, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.). As etapas de propagação foram realizadas de forma semelhante ao que descrevemos acima para CE (**Figura 8**). As etapas para a construção do adenovírus recombinante serão descritas a seguir, na seção **3.7.1.** deste capítulo.

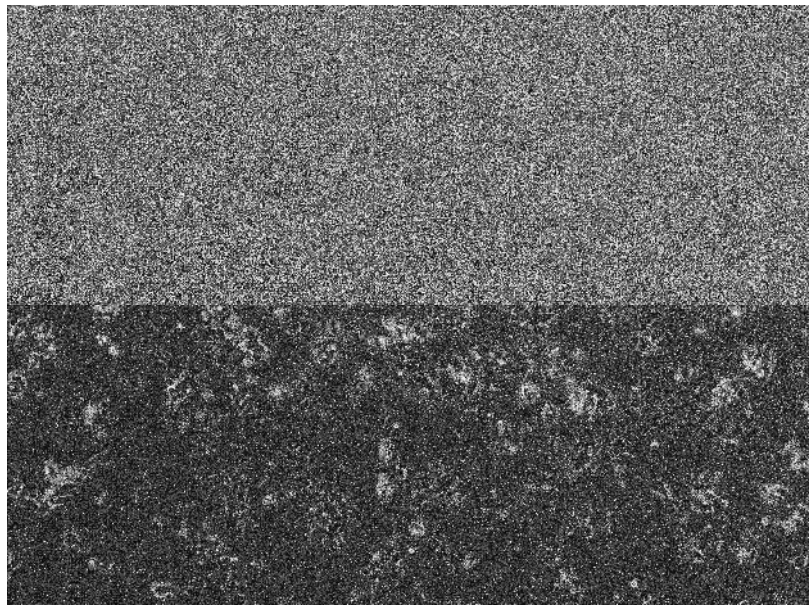


Figura 8 – Células 293 em cultura (2º dia). 40X.

3.2. PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

Com o objetivo de realizarmos a transferência genética não-viral do gene *A1 wild type* (**Figura 9**) ou de mutantes do gene *A1*, obtidos a partir de deleções específicas (*A1Δm*), procedemos à inserção desses genes em plasmídeos de expressão. A realização destes procedimentos foi possível devido à utilização das seguintes técnicas básicas de biologia molecular: digestão do cDNA com enzimas endonucleases de restrição, ligação

dos fragmentos de DNA resultantes através de enzimas ligases T4, amplificação de DNA através da reação de polimerização em cadeia (PCR), e deleção de sequências internas de sequências específicas do gene *A1* (domínios BH ou TM), através da polimerização em cadeia com *overlap extension* (OLE-PCR).

Para análise funcional dos genes transferidos (*A1* e *A1Δm*) e correção da eficácia dos experimentos de transferência genética não-viral para CE, foram utilizados plasmídeos repórteres, codificando sequências dos genes luciferase (plasmídeo NF- κ B/luciferase) e β -galactosidase (plasmídeo RSV/ β -gal), respectivamente, conforme descrito a seguir.

```
5'-ATGACAGACTGTGAATTTGGATATATTTACAGGCTGGCTCAGGACTATC
TGCAGTGCGTCCTACAGATACCACAACCTGGATCAGGTCCAAGCAAACGTCCAGAGTGCTACAA
AATGTTGCGTTCTCAGTCCAAAAGAAGTGGAAAAGAATCTGAAGTCATGCTTGGACAATGTTAA
TGTTGTGTCCGTAGACTGCCAGAACACTATTCAACCAAGTGATGGAAAAGGAGTTTGAAGACG
GCATCATTAACTGGGGAAGAATTGTAACCATATTTGCATTTGAAGGTATTCTCATCAAGAACTTC
TACGACAGCAAATTGCCCCGGATGTGGATACCTATAAGGAGATTTCATATTTTGTGCGGAGTTC
ATAATGAATAACACAGGAGAATGGATAAGGCAAACGGAGGCTGGGAAAATGGCTTTGTAAAGAA
GTTTGAACCTAAATCTGGCTGGATG-3'
```

Figura 9 – Sequência do gene *A1* humano

3.2.1 - Plasmídeo pcDNA₃.HA-A1

Devido à ausência de um anticorpo eficaz para a identificação da proteína A1, construímos um plasmídeo de expressão codificando a sequência do gene *A1*, marcado (*tagged*) em sua porção N-terminal com uma sequência codificadora da hemaglutinina (HA). A construção deste plasmídeo, denominado pcDNA₃.HA-A1, foi possível através da obtenção prévia de cDNA de A1, pela técnica de PCR por transcriptase reversa (RT-PCR), a partir de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) estimuladas com TNF [BADRICHANI *et al.*, 1999]. Para as reações de amplificação em cadeia, foram utilizadas as seguintes sequências de "primers", "sense" (S) e "anti-sense" (AS):

S : 5'-TTGCTCGGATCCAGGCAGAAGATGACAG-3'

A : 5'-GTGTGAATTCTGGTCAACAGTATTGC-3'.

O produto da reação PCR foi então clonado no plasmídeo pcDNA₃, disponível comercialmente (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), após marcação com a sequência do nonapeptídeo hemaglutinina: YPYDVPDYA (**Figura 10**) Esta etapa do experimento foi realizada previamente pelo Dr. J. Anrather, no mesmo laboratório.

Após a realização desta construção, confirmamos a sequência das mutações desejadas, através da técnica de sequenciamento automatizado de DNA, em equipamento modelo *ABI 310 Prism®* (Perking Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.), conforme será descrito na seção **3.4**. Este plasmídeo foi utilizado nos primeiros experimentos de transfecção não-viral.

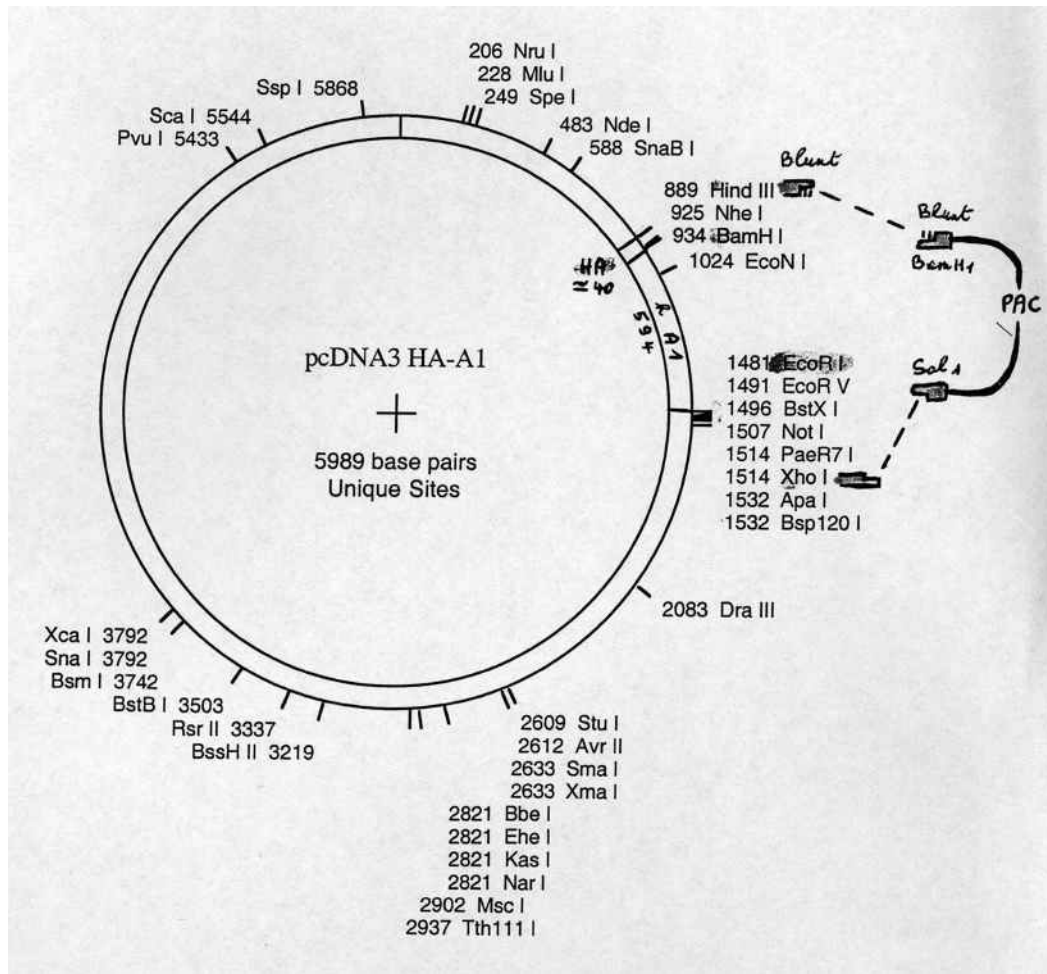


Figura 10 – Mapa do plasmídeo de expressão pcDNA₃.HA-A1.

3.2.2. Plasmídeo pAC.HA-A1

Para a construção do plasmídeo pAC.HA-A1, mais adequado para as etapas de construção de adenovírus recombinante, conforme já exposto, foi necessária a utilização das enzimas de restrição de endonucleases *BamHI* e *SalI* para extração da sequência HA-A1, a partir do plasmídeo pcDNA₃.HA-A1. Em seguida, realizamos a inserção do produto HA-A1, amplificado por PCR, no plasmídeo de expressão pAC.CMV.PLPASR(+), doado

gentilmente pelo seu criador, Prof. Robert Gérard, da *University of Texas, Southwestern*, TX, EUA. O plasmídeo de expressão pAC.CMV.PLPASR(+) caracteriza-se por ser um plasmídeo de 8,8 Kb de extensão, que contém um promotor CMV (760 pb), um sítio poliA/*splice* SV40 (470 pb), um sítio expressando um gene de resistência à ampicilina e uma sequência modificada do adenovírus 5 (Ad5) (**Figura 11**). Observa-se ainda, em sua região *polylinker*, os sítios de restrição: *EcoRI*, *KpnI*, *BamHI*, *XbaI*, *SaI* e *HindIII*.

Optamos por utilizar esse plasmídeo para as experiências de transferência do gene *A1* para CE, visando à posterior construção de um adenovírus recombinante A1, conforme será descrito na seção **3.7.1**.

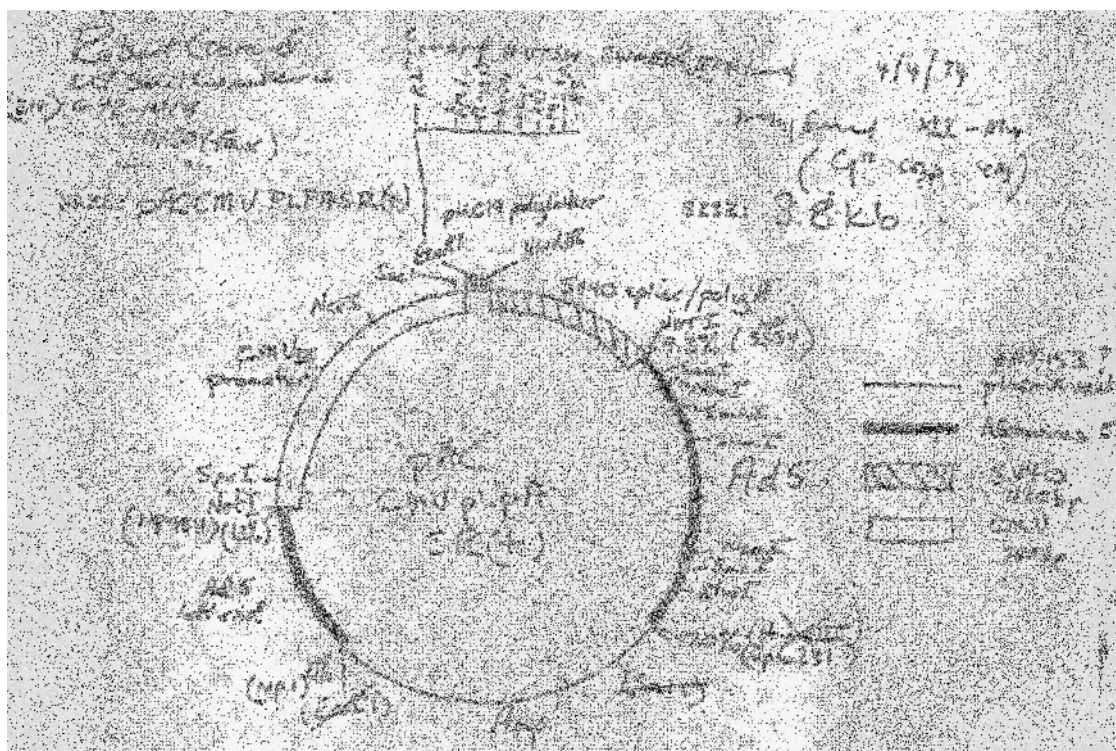


Figura 11 – Mapa do plasmídeo de expressão pAC.CMV.PLPASR(+). Desenho à mão do próprio autor, Prof. Robert Gérard, da *University of Texas, Southwestern, TX*, E.U.A.

3.2.3. Construção de plasmídeos mutantes de *A1* (**A1Δm**)

Para a realização da análise morfo-funcional do gene *A1* em CE, construímos plasmídeos codificando mutações do gene *A1*, dirigidas para o domínio transmembrana (A1ΔTM) e para o domínio, de homologia ao gene *Bcl-2*, BH4 (A1ΔBH4).

3.2.3.1. Plasmídeo pAC.HA-A1ΔTM

Com o objetivo de avaliar o papel do domínio carboxi-terminal transmembrana (TM) do gene *A1*, utilizamos inicialmente a técnica de amplificação por polimerase em cadeia (PCR). Inicialmente construímos um plasmídeo contendo a sequência genética de *A1* privada do domínio TM. Em seguida, procedemos à inserção do produto obtido (A1ΔTM) no vetor pAC, obtendo o plasmídeo pAC.HA-A1ΔTM.

Para a etapa de deleção do domínio TM, utilizamos os seguintes *primers*:

S: 5'-CGCGGGGTACCCCATGTATCCTTATGATGTT-3'

AS: 5'-CCCCAAGCTTGGTTACATCCAGCCAGATTTAGG-3'

Para cada reação foram misturados os reagentes nas seguintes concentrações:

300 μg de DNA (plasmídeo pAC-HA-A1);
200 μM de bases nitrogenadas (dNTP);
0,3 μM de cada *primer* (*sense* e *anti-sense*);
2,5 mM de MgCl₂;
10 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl;
2,5 unidades/100 μl de Taq polimerase.

A solução foi complementada com água bi-distilada estéril, obtendo-se um volume final de 50 µl/tubo. Com exceção do plasmídeo pAC-HA-A1, todos os produtos utilizados foram encomendados de Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, EUA), utilizando frascos tipo Eppendorf® de 0,5 ml, de acordo com o programa descrito na **Tabela 2**:

Nº do CICLO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	94°C	4 min
2	94°C	30 seg.
3	50°C	30 seg.
4	72°C	40 seg.
* Repetir 5 vezes os ciclos nº2, nº3 e nº4		
5	94°C	30 seg.
6	65°C	30 seg.
7	72°C	30 seg.
* Repetir 20 vezes os ciclos nº5, nº6 e nº7		
8	72°C	5 min.
9	4°C	10 min.
* Fim da reação		

Tabela 2 – Etapas da amplificação do gene *A1* ou *A1ΔM* através da reação de polimerase em cadeia (PCR).

3.2.3.2 – Purificação do produto *A1ΔTM* após amplificação por PCR

Após a realização da PCR, alíquotas de 30 µl de cada frasco foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 2%. A transiluminação com luz ultra-violeta permitiu a visualização do produto de amplificação desejado (**Figura 12**).

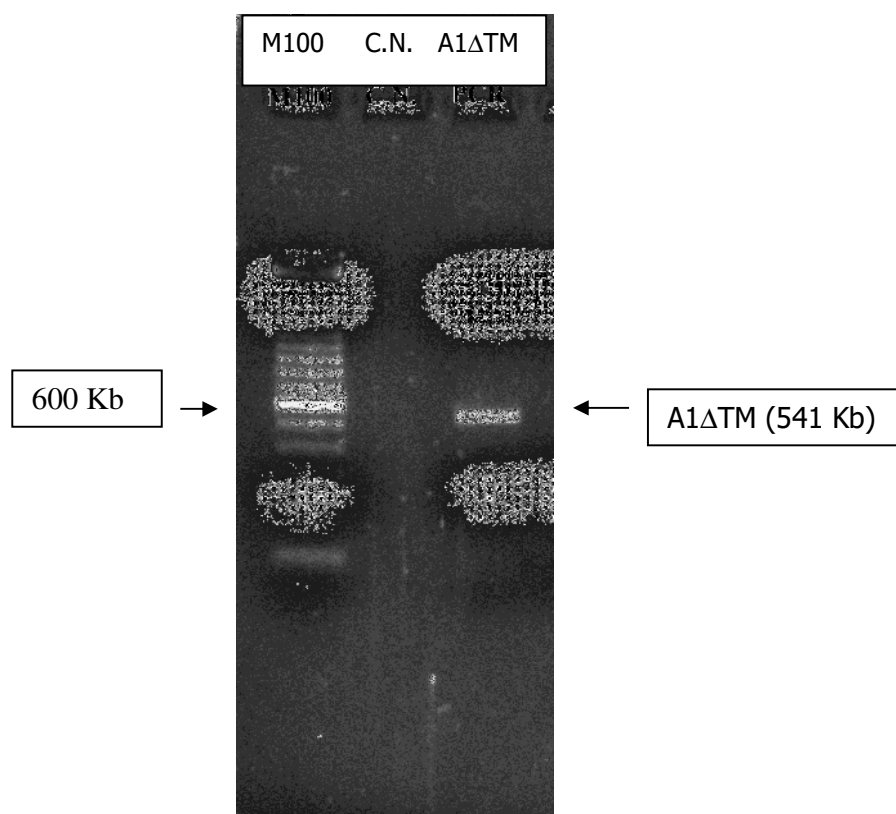


Figura 12 – Produto A1ΔTM, após amplificação por PCR. Eletroforese, gel de agarose a 2%. M100=marcador (intervalo de 100 Kb); C.N.=controle negativo.

O produto A1ΔTM foi em seguida purificado utilizando-se o protocolo de purificação QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia, CA, E.U.A). O procedimento consiste da extração, com lâmina de bisturi, do fragmento de gel de agarose a 2% contendo o produto da reação PCR, sob visualização em luz ultra-violeta. O fragmento é então diluído em tampão apropriado (PB), colocado sobre uma coluna de adsorção (QIAquick®) e centrifugado a 13.200 rpm por 1 min. Procede-se a lavagem da coluna com 750 µl de tampão PE (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0 em 15% de etanol). A última etapa do processo consiste da diluição do produto de PCR em um tubo de 1,5 ml utilizando-se 50 µl de tampão EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). A concentração final de DNA foi mensurada

utilizando-se um espectrofotômetro modelo DU 640 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, E.U.A.) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, sob iluminação ultravioleta.

3.2.3.3. Inserção do produto A1ΔTM no plasmídeo pAC

A inserção do produto de amplificação A1ΔTM no plasmídeo pAC foi obtida através das reações sequenciais de digestão dos produtos (A1ΔTM e pAC) com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII*, a 37°C, durante 4 h, seguida de ligação dos produtos digeridos através da enzima T4 ligase, a 15°C, durante a noite (12 h).

3.2.3.4. Eletroporação bacteriana e seleção de clones

Após a ligação dos produtos A1ΔTM e pAC procedeu-se à eletroporação bacteriana, utilizando-se bactérias eletro-competentes do tipo DH5α. Em seguida a mistura foi semeada em placas de Petri e incubada durante a noite (16 h) a 37°C em meio contendo agar-ampicilina. Após o período de incubação, colônias identificadas a olho nú foram devidamente amplificadas em meio LB (10 g/l de bacto-tryptona, 5 g/l de bacto-levedura, 10g/l de NaCl) (Fischer Scientific, PA, E.U.A.) a 37°C e selecionadas após identificação do transgene (A1ΔTM) após nova reação de PCR utilizando as bactérias como fonte do DNA (**Figura 13**). As colônias positivas foram identificadas e re-incubadas em 300 ml de meio ampicilina-LB a 37°C durante a noite, sob agitação mecânica. No dia seguinte foi realizada a purificação dos plasmídeos utilizando-se o kit de purificação QIAgen®.

Para confirmação da ausência de mutações indesejadas, o produto purificado pAC.HA-A1 Δ TM foi submetido a sequenciamento genético automatizado, conforme descrito na seção **3.4**.

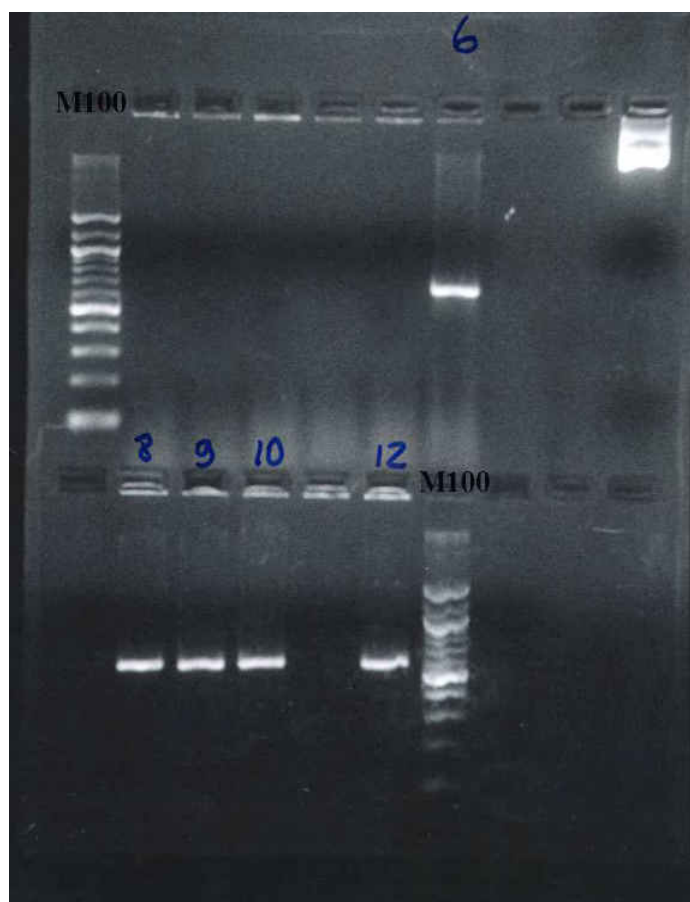


Figura 13 – Seleção de clones positivos para HA-A1 Δ TM através de amplificação por PCR. Eletroforese em gel de agarose a 2%.

3.2.4. Plasmídeo pAC.HA-A1 Δ BH4

Para obtenção de um plasmídeo de expressão codificando o gene *A1* privado do domínio BH4 (pAC.A1 Δ BH4), utilizamos a técnica de deleção dirigida baseada na amplificação por PCR com *overlap extension* (OLE-PCR), representada na **Figura 14**.

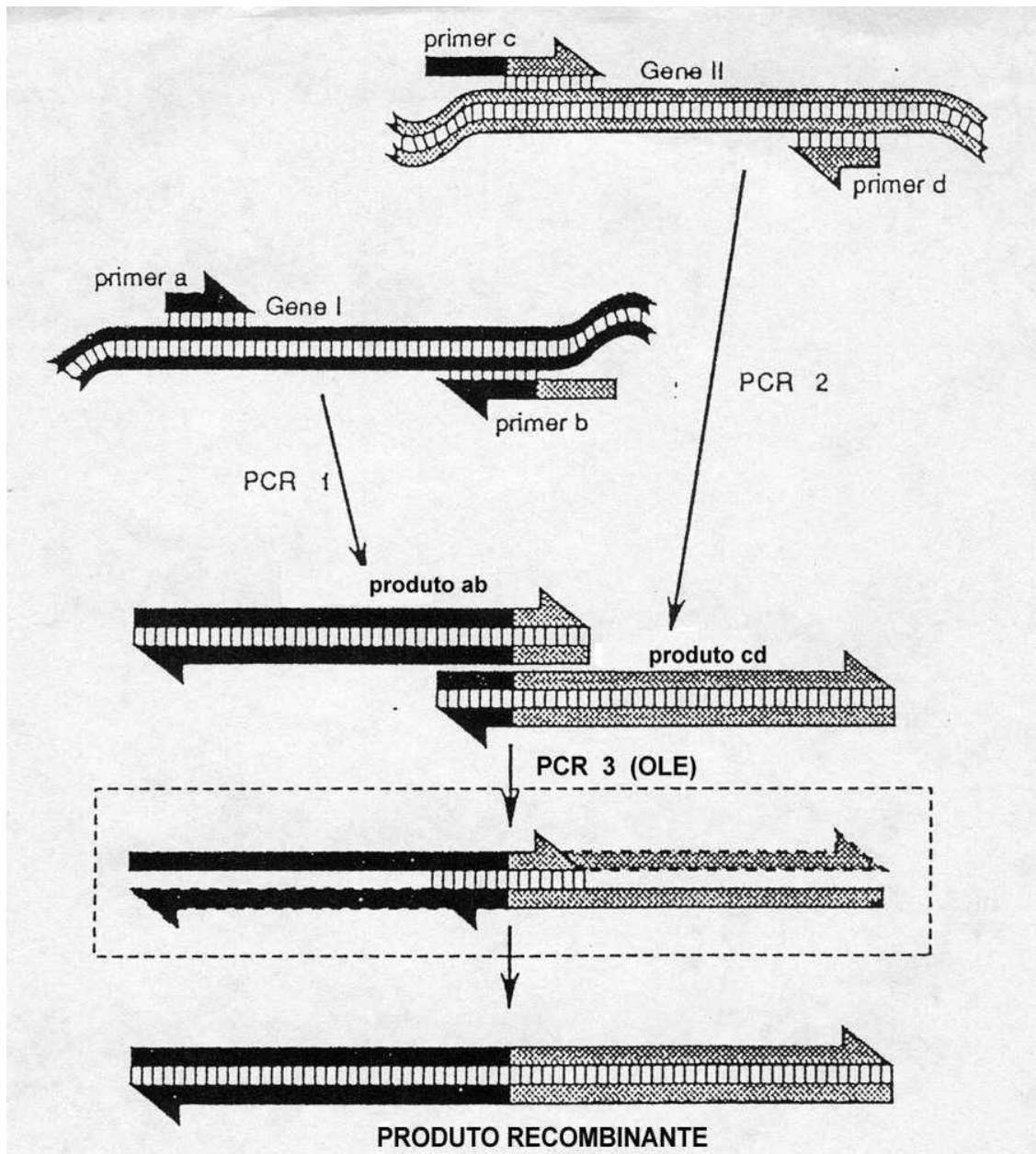


Figura 14. Representação da reação de amplificação por *overlap extension* (OLE-PCR). Inicialmente reações independentes de amplificação (PCR Nº 1 e Nº 2) geram produtos (ab e cd), que compartilham de uma mesma sequência de bases, Numa terceira reação (PCR Nº 3) estes produtos interagem como *primers*, gerando o produto recombinante desejado.

Para obtenção do produto A1ΔBH4 foram utilizados os seguintes *primers*, encomendados de Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA:

Reação PCR N° 1

Sense A : 5'-CGCGGGGTACCCATGTATCCTTATGATGTT-3'

Anti-sense B : 5'-TTCCACTTCTTTAGGTTGTGGTATCTGTAGGAC-3'

Reação PCR N° 2

Sense C : 5'-CCACAACCTAAAGAAGTGGAAAAGAATCTGAAG-3'

Anti-sense D : 5'-CCCCAAGCTTGGTCAACAGTATTGCTTCA-3'

Os *primers* **anti-sense B** e **Sense C** são os *primers* que se sobrepõem, enquanto os *primers* **Sense A** e **Anti-sense D** contêm os sítios de enzimas de restrição *Kpn1* e *Hind3* (sublinhados), respectivamente, que foram posteriormente utilizados para clonagem do produto de amplificação (A1ΔBH4) no plasmídeo pAC.

Após a realização das reações de amplificação de N° 1 e N° 2, uma nova reação de amplificação (N° 3), utilizando os produtos das reações anteriores, resultou no produto A1ΔBH4. As etapas subsequentes foram realizadas de forma semelhante às descritas anteriormente para purificação, digestão por enzimas de restrição, ligação e inserção do produto A1ΔBH4 no plasmídeo de expressão pAC. (**seção 3.2.3.**). O sequenciamento genético automatizado confirmou a deleção do domínio BH4 de A1.

3.2.5. Plasmídeo pAC.HA-polyBH4

Para avaliação da função isolada do domínio BH4 de A1 em CE foi necessária a construção de uma mutação gênica codificando a sequência BH4 repetida por 4 vezes, clonando-a em seguida em pAC. O plasmídeo de expressão resultante do processo foi denominado pAC.HA-polyBH4. O processo de clonagem, concluído após três etapas sucessivas de amplificação, encontra-se resumido na **Figura 15**.

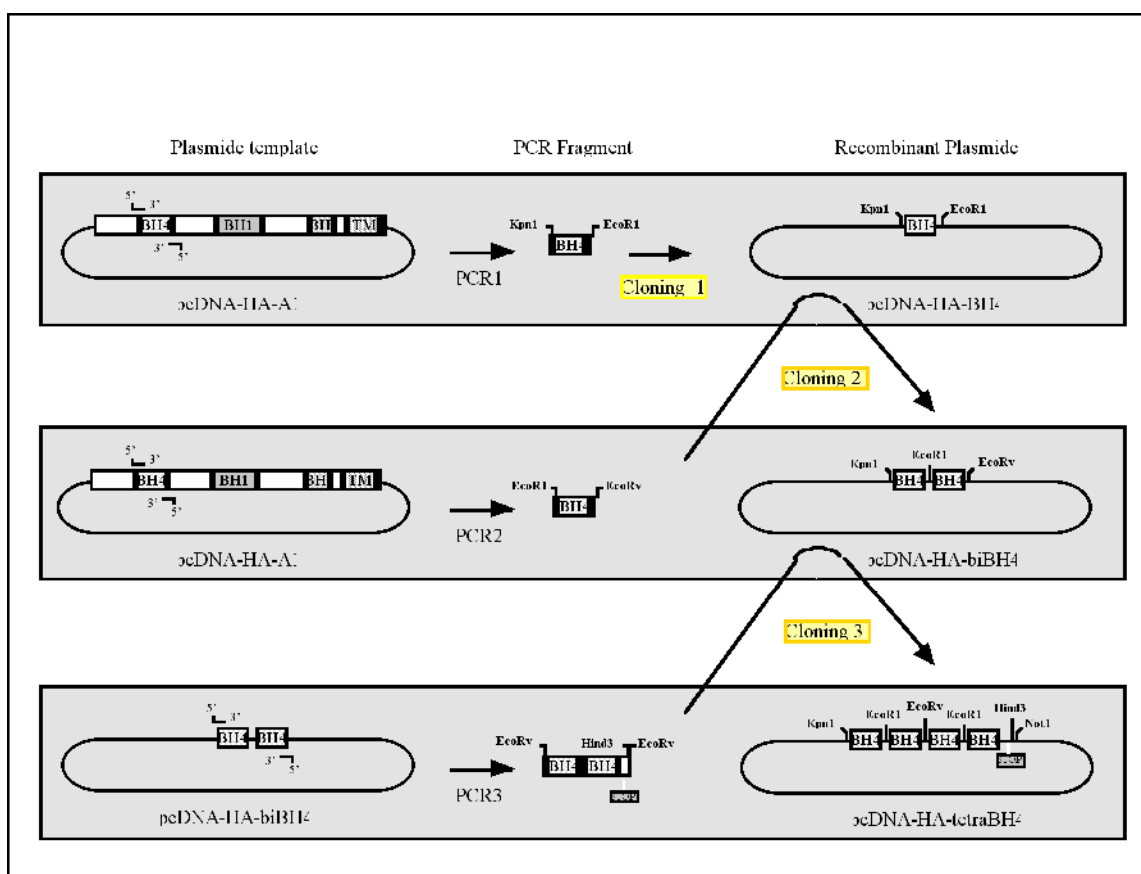


Figura 15. Etapas de amplificação por PCR para construção do plasmídeo pAC.HA-polyBH4.

A primeira etapa consistiu de uma reação de amplificação de DNA, a partir de uma matriz contendo o gene A1 (pcDNA.HA-A1), utilizando-se os seguintes *primers* dirigidos para o domínio BH4:

S : 5'-CGCGGGGTACCCCATGTATCCTTATGATGTT-3'

AS : 5'-ATCGGCGGCGAATTCCACTTCTTTTTGGACTGAG-3'

Os *primers sense* e *anti-sense* contêm, respectivamente, os sítios de restrição *Kpn1* e *EcoR1* (sublinhados), utilizados para clonagem do produto de PCR (BH4) no plasmídeo pcDNA3.HA, gerando o plasmídeo pcDNA-BH4 (pcDNA3.HA-*Kpn1*/BH4/*EcoR1*).

A segunda etapa consistiu da clonagem do domínio BH4 no plasmídeo pcDNA3HA-*Kpn1*/BH4/*EcoR1*, construído na etapa anterior. Um novo produto foi gerado por nova reação de amplificação, utilizando os seguintes *primers*:

S: 5'-GATGCCGCGAATTCCCACAACCTGGATCAGG-3'

AS : 5'-CTAGGCGGCGATATCCACTTCTTTTTGGACTGAG-3'

Os *primers* utilizados nessa reação (Nº 2) contêm os sítios de restrição *EcoR1* e *EcoRv* (sublinhados). Após inserção do novo produto de PCR no plasmídeo pcDNA3HA-*Kpn1*/BH4/*EcoR1*, obtivemos um novo plasmídeo contendo 2 sequências repetidas do domínio BH4, que denominamos pcDNAbiBH4 (pcDNA3HA-*Kpn1*/BH4/*EcoR1*/BH4/*EcoRv*).

Para obtenção do produto final, contendo 4 domínios BH4, utilizamos o plasmídeo pcDNAbiBH4 para gerar, através de nova reação de amplificação, um produto contendo 2

sequências repetidas de BH4. Nessa nova reação de amplificação foram utilizados os seguintes *primers*:

S : 5'-GATGCCGCCGATATCCTACAGATACCACAACCT-3'

AS : 5'-GCATGCTCGAGCGGCCGC AAGCTTCATTAATCCACTTCTTTTTGG-3'

Esses *primers* contêm os sítios de restrição *EcoRv* e *Not1* (sublinhados), respectivamente. Um *codon* de interrupção (OCH) e um sítio de restrição extra codificando para *Hind3* (duplo sublinhado) foram adicionados ao *primer anti-sense*. O plasmídeo recombinante final, codificando 4 sequências do domínio BH4, foi denominado HA-polyBH4 (pcDNA3HA^{-Kpn1}/BH4/_{EcoR1}/BH4/_{EcoRv}/BH4/Hind3/_{Not1}). (**Figura 15**).

Passos semelhantes foram seguidos para a inserção do produto HA-polyBH4 no plasmídeo de expressão pAC. O sequenciamento genético automatizado permitiu a confirmação das mutações dirigidas desejadas.

3.3. PLASMÍDEOS REPÓRTERES

3.3.1. Plasmídeo repórter NF-κB-luciferase

O plasmídeo repórter NF-κB-luciferase havia sido construído anteriormente no laboratório. Consiste de 4 cópias de elementos NF-κB, retirados do promotor do gene E-seletina do porco, inseridos acima de um promotor mínimo TK controlando o gene da

luciferase. O esqueleto do vetor foi originado a partir do plasmídeo disponível comercialmente Bluescript KS+ (Stratagene, La Jolla CA, E.U.A.).

3.3.2. Plasmídeo repórter RSV/ β -galactosidase (RSV/ β -gal)

Para correção da eficácia das transfecções utilizamos um plasmídeo repórter codificando o gene da β -galactosidase, obtido de *E.coli* (Clontech) e clonado previamente no mesmo laboratório a partir do vetor pRc/RSV (Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.) utilizando o sítio de restrição *NotI*.

3.4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

A sequência precisa de cada um dos mutantes de A1 foi confirmada através de sequenciamento genético automatizado utilizando-se o equipamento *ABI 310 Prism®* (Perking Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.), de acordo com o seguinte protocolo:

3.4.1. Reação de amplificação com cadeia simples de DNA

A primeira etapa no sequenciamento dos mutantes do gene A1 (A1 Δ m) consistiu de uma reação de amplificação de DNA de cadeia simples, usando os respectivos plasmídeos mutantes como base. As reações foram realizadas em duplicata para cada plasmídeo usando os *primers S* e *AS*, de acordo com o produto analisado. Os reagentes utilizados para cada reação foram:

Mistura pronta para reação "Terminator"	4 µl
DNA dupla hélice (plasmídeo Δm)	0,3 a 0,5 µg
Primer	3,2 pmole
H ₂ O bi-destilada	completando o volume
Volume final	10 µl

As reações de amplificação foram realizadas em frascos de 50 µl, em termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, EUA), utilizando-se o seguinte programa:

Nº do CICLO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	94°C	10 seg.
2	50°C	5 seg.
3	60°C	4 min.
* Repetir 25 vezes os ciclos nº1, nº2 e nº3		
4	4°C	10 min.
* Fim da reação		

Tabela 3 – Etapas da amplificação com polimerase em cadeia (PCR) para sequenciamento genético.

3.4.2. Purificação dos produtos de amplificação por PCR

Os produtos resultantes das reações de amplificação foram precipitados em tubos de 1,5 ml utilizando-se 2 µl de acetato de sódio 3M, pH 4,6 e 50 µl de etanol a 100%. O precipitado foi agitado em misturador tipo Vortex® e, após repouso em bacia com gelo (4°C), centrifugado a 13.200 rpm por 30 min. Posteriormente o sobrenadante foi desprezado e o resíduo lavado com 250 µl de etanol a 70%. Após uma nova centrifugação

a 13.200 rpm por 30 min o resíduo contendo DNA foi colocado em ar ambiente para secagem.

3.4.3. Sequenciamento genético automatizado

As amostras contendo DNA foram re-suspensas em 20 µl de reagente tipo *Template Suppression Reagent* (P/N 401674) (Perking Elmer, E.U.A.), agitadas em misturados tipo Vortex®, centrifugadas a 13.200 rpm e aquecidas a 95°C por 2 min. Após nova agitação as amostras foram novamente centrifugadas e inseridas no sequenciador automático *ABI PRISM 310* (Perking Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.).

3.5. TRANSFERÊNCIA GENÉTICA MEDIADA POR LIPOSSOMAS CATIÔNICOS

3.5.1. Protocolo experimental

Com o objetivo de avaliar a função do gene A1 ou de seus mutantes (A1Δm) em CE, utilizamos o método de transferência genética mediada por lipossomas catiônicos [FELGNER *et al.*, 1987; ROSE, BUONOCORE, WHITT, 1991].

BAEC em cultura foram co-transfectadas utilizando-se Lipofectamine® (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.). Cada experimento foi realizado em triplicatas em capela de fluxo laminar em condições estéreis. BAEC foram cultivadas em frascos de cultura contendo 6 poços/frasco (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca).

Em cada poço utilizamos a seguinte mistura de plasmídeos (**Figura 16**):

Plasmídeos de expressão:

- 0,7 µg/poço de plasmídeos pAC vazio (controle) ou contendo o gene *A1* (*wild type* ou *A1Δm*);

Plasmídeos repórteres:

- 0,6 µg/poço de plasmídeos repórter NF-κB-luciferase;
- 0,3 µg/poço de plasmídeos repórter RSV/β-gal.

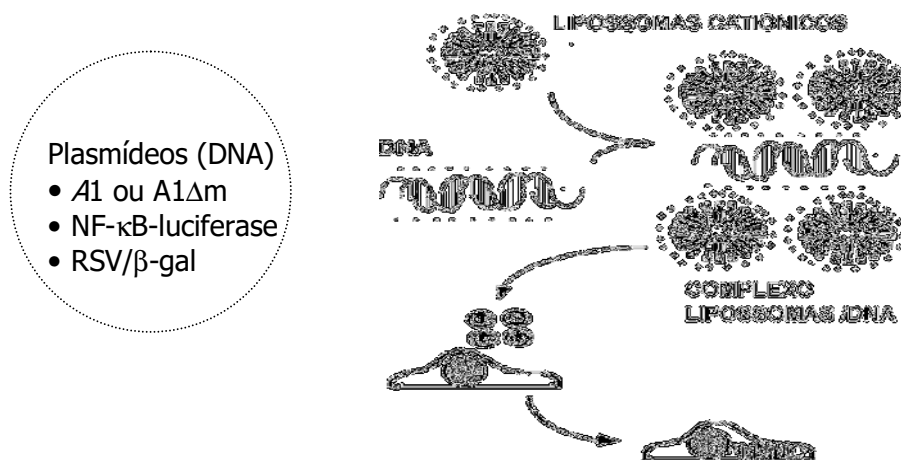


Figura 16 – Transferência genética mediada por lipossomas catiônicos.

BAEC em frascos de cultura contendo 6 poços foram lavadas 2 vezes com DMEM a 37°C desprovido de SFB ao atingirem 70% de confluência. Plasmídeos de expressão [pAC,

pAC.HA-A1 ou pAC. Δ m (0.7 μ g/poço)] e repórteres [RSV/ β -gal (0.3 μ g/poço) e NF- κ B/luciferase (0.6 μ g/poço)] foram pré-incubados com Lipofectamine[®] (8 μ g/poço) durante 30 min em DMEM a 37°C desprovido de SFB. Posteriormente a mistura contendo os 3 tipos de plasmídeos foi adicionada a cada poço lavado (1ml/poço).

Após um período de incubação de 5 h em estufa com CO₂ a 5% a 37°C, adicionamos 1 ml de meio de cultura contendo soro fetal (20% de SFB em DMEM) com a finalidade de interromper o processo de transfecção e limitar a toxicidade induzida pelos lipossomas catiónicos (ref). Após novo período de incubação durante a noite (16 h) o meio de cultura foi trocado (DMEM com SFB a 10%, 50 UI/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina). Em seguida as células em cultura foram re-incubadas por um período adicional de 24 h antes da realização dos experimentos de indução ativação de CE.

3.5.2. Indução de ativação de CE

O processo de ativação das CE *in vitro* foi realizado através da utilização de TNF recombinante humano (100 UI/ml). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, com os resultados expressos em erro padrão (\pm SE) em pelo menos 3 amostras. Poços de cultura de células contendo BAEC não estimuladas foram utilizados como controle. A avaliação do grau de ativação das CE em cultura foi realizada através da mensuração de quimioluminescência, a partir da atividade enzimática dos genes repórteres luciferase e β -galactosidase [BRASIER, TATE, HABENER, 1989; JAIN & MAGRATH, 1991].

3.5.2.1. Coleta das CE para medida de atividade de luciferase e β -galactosidase

CE foram coletadas 7 horas após a estimulação com TNF. Os frascos de cultura foram lavados 2 vezes com PBS a 4°C e posteriormente as BAEC foram lisadas com 200 μ l/poço de tampão de lise (0,1 M de KH_2PO_4 , Triton a 0.05% e 1 mM de DTT) a 4°C em câmara fria. Lisados celulares foram transferidos para placas contendo 96 poços com fundo em V (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca) e centrifugadas por 10 min a 2.500 rpm a 4°C. Amostras de sobrenadante foram utilizadas para mensuração de atividade de luciferase e de β -galactosidase.

3.5.2.2. Mensuração de atividade de luciferase e β -galactosidase

A atividade enzimática de luciferase foi mensurada em equipamento tipo luminômetro modelo *Microlumaf LB 96P* (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Para cada reação, realizada em placas de 96 poços, foram misturados 10 μ l de extrato celular e 90 μ l de uma solução contendo 24 mM de glicil-glicina (pH 7.8), 2 mM de ATP (pH 7.5) e 10 mM de MgSO_4 . Utilizamos como substrato para a reação uma mistura de 24 mM de glicil-glicina e 0,1 mM de luciferina (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, E.U.A.).

Para mensuração da atividade enzimática de β -galactosidase utilizamos o produto *Galacto-Light*[®] (Tropix, Inc., Bedford, MA, E.U.A.). A reação foi realizada em placas contendo 96 poços, onde foram misturados 10 μ l de extrato celular e 40 μ l de uma diluição 1:100 de galacton por poço. A leitura de atividade foi realizada em equipamento

luminômetro modelo *Microlumat LB 96P* (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha) tendo como substrato enzimático o produto *Tropix Light Emission Accelerator* (Tropix, Inc., Bedford, MA, E.U.A.).

Os resultados das atividades enzimáticas de luciferase e de β -galactosidase foram indexados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mathbf{L.A./\beta A \times 100}$$

Onde: L.A. significa atividade medida de luciferase e β A representa a atividade medida de β -galactosidase. Os resultados obtidos através dessa indexação foram expressos como unidades de iluminação relativa (u.r.l.).

3.5.3. Indução de apoptose de CE

Como já foi descrito, CE são habitualmente resistentes à apoptose induzida por estímulos inflamatórios mas tornam-se sensíveis quando a síntese protéica é inibida. O processo de indução de apoptose de CE *in vitro* foi obtido, através da estimulação com TNF em CE tratadas com o inibidor de síntese protéica cicloheximida (CHX). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, com os resultados expressos em erro padrão (\pm SE) em pelo menos 3 amostras. Poços de cultura de células contendo BAEC tratadas com CHX, porém não estimuladas, foram utilizados como controle.

3.5.3.1. Indução de apoptose

Com o objetivo de analisar a função anti-apoptótica do gene A1 e mutantes A1Δm transferidos para CE utilizamos o protocolo experimental descrito na seção 3.5.1. com pequenas variações. BAEC cultivadas em frascos de cultura com 6 poços foram co-transfectadas utilizando-se o reagente lipofectamine plus® (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.). Os mesmos plasmídeos de expressão descritos acima (A1, A1Δm ou controle pAC) foram utilizados, porém na concentração de 1 µg/poço. Utilizamos como plasmídeo reporter apenas o RSV-β-gal, na concentração de 0.5 µg/poço. Após 24 h de transfecção com os plasmídeos citados, BAEC foram tratadas com 2 µg/ml of CHX (Sigma-Aldrich, Co., Irvine, Reino Unido) (grupo 1) ou com 2 µg/ml of CHX seguido de 200 UI/ml de TNF, após 30 min (grupo 2). Após 12 h de incubação com os respectivos tratamentos as células foram fixadas com glutaraldeído a 0,05% e coradas com 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosida por 4 h

3.5.3.2. Análise de viabilidade celular

BAEC foram analisadas por m.o. com contraste de fase 4 h após o período de coloração descrito acima. A viabilidade celular foi avaliada por 2 observadores distintos, contando-se o número de células coradas em azul (positivas para β-galactosidase) em 10 campos escolhidos aleatoriamente, com aumento de 40 vezes por poço. Os resultados de viabilidade celular estão expressos em percentual, analisando-se o percentual de células viáveis no grupo 2 (CHX/TNF) com relação ao número de células viáveis no grupo 1 (CHX).

3.6. ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.6.1. Isolamento de proteínas

Extratos citoplasmáticos foram preparados, a partir das culturas de BAEC transfectadas, para isolamento de proteínas. Placas de cultura contendo 6 poços cada (aproximadamente 10^6 CE/poço) foram lavadas 2 vezes com PBS a 4°C, re-suspensas com a utilização de micropipetas de 1000 µl e, a seguir, centrifugadas por 10 min a 2.500 rpm. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo CE foi incubado por 30 min a 4°C em tubos tipo Eppendorf® de 1,5 ml contendo 70 µl de tampão de lise (10 mM TRIS pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100) adicionado de aprotinina (0,5 µg/ml), leupeptina, antipaina, e 0,5 mM de PMSF. Após o período de incubação o lisado foi submetido a centrifugação por 30 min a 13.200 rpm. Em seguida o sobrenadante foi coletado e submetido a quantificação proteica.

3.6.2. Quantificação protéica

A quantificação protéica dos extratos citoplasmáticos foi realizada utilizando-se o método descrito por Bradford [1976]. Diluímos 1 parte o reagente azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad, Life Laboratories, NY, E.U.A.) em 4 partes de água bi-destilada deionizada, distribuindo a mistura em tubos de 1 ml por reação. Amostras de extratos citoplasmáticos foram diluídas em tubos individuais e, após 5 min de incubação em temperatura ambiente

a absorvância foi medida a 595 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro modelo *DU 640* (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, E.U.A.).

3.6.3. Immunoblotting

Para detecção da expressão das proteína A1 e mutantes de A1 utilizamos a técnica de *immunoblotting* [SHAPIRO, VINUELA, MAIZEL, 1967; TOWBIN, STAEHELIN, GORDON, 1979]. Após preparação de um gel de poliacrilamida a 12,5%, 20 µg de proteína citoplasmática de BAEC foi depositada por poço e o gel submetido a eletroforese utilizando-se mini-cubas (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Em seguida procedeu-se à transferência protéica para membranas tipo *Immobilon-P* (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) utilizando-se equipamento de transferência semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.). Após 1 h de transferência a 40 mA as membranas foram retiradas do equipamento e banhadas em solução contendo leite desidratado diluído a 5% em *tween 20* PBS. Cada membrana foi incubada com a mesma solução durante a noite a 4°C e na manhã seguinte a reação para detecção de proteína HA-A1 foi realizada, utilizando-se um anticorpo primário monoclonal de rato anti-hemaglutinina, diluído 1/1000 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, E.U.A.), seguido de um anticorpo secundário policlonal de cabra anti-rato conjugado com peroxidase (Pierce, Rockford, IL, E.U.A.) na diluição 1/3000. A reação foi revelada em câmara escura utilizando-se a técnica de quimiluminescência ampliada (ECL, Amersham, Arlington Hights, IL, E.U.A.).

3.7. TRANSFERÊNCIA GENÉTICA MEDIADA POR ADENOVÍRUS

Com o objetivo de obter alta expressão de proteína A1 transgênica em CE, optamos pela construção de um adenovírus recombinante (**r.Ad**) a ser utilizado como vetor de transferência. A produção de títulos elevados de **r.Ad** é realizada em células geneticamente modificadas do tipo 293 [GRAHAM & PREVEC, 1991].

Todas manipulações foram realizadas em uma unidade com nível 2 de biosegurança, disponível no laboratório. As etapas para construção de **r.Ad**, descritas a seguir, dividem-se em: transfecção, recombinação, purificação, titulação e propagação. A confirmação definitiva do sucesso na geração de **r.Ad** só ocorre após a detecção da proteína recombinante em células infectadas pelo vírus.

3.7.1. Construção de adenovírus recombinante (Ad.A1ΔTM)

A construção de um adenovírus recombinante codificando o gene A1 desprovido de seu domínio transmembrana (A1ΔTM), foi iniciada pela transfecção mediada por lipossomas catiônicos de células 293 em cultura, de forma semelhante à descrita na **seção 3.5.1**. Plasmídeos codificando as sequências do adenovírus 5 (Ad5) e do gene A1 (pJM17 e pAC.HA-A1ΔTM, respectivamente) foram incubados com células 293 cultivadas em placas de 6 poços ao atingirem 50 a 60% de confluência. Utilizamos uma concentração de 2 µg de DNA por poço (0.6 µg of pJM17 e 1.4 mg of A1ΔTM) diluídos em 1 ml de DMEM (sem antibióticos ou SFB). Após um período de 5 h de incubação adicionamos FBS até obtermos uma concentração final de 10% FBS em DMEM. O meio de cultura foi renovado no dia seguinte e as placas de cultura observadas diariamente, até a

constatação do efeito citopático característico (**Figuras 17 a 19**), confirmatório da recombinação desejada.

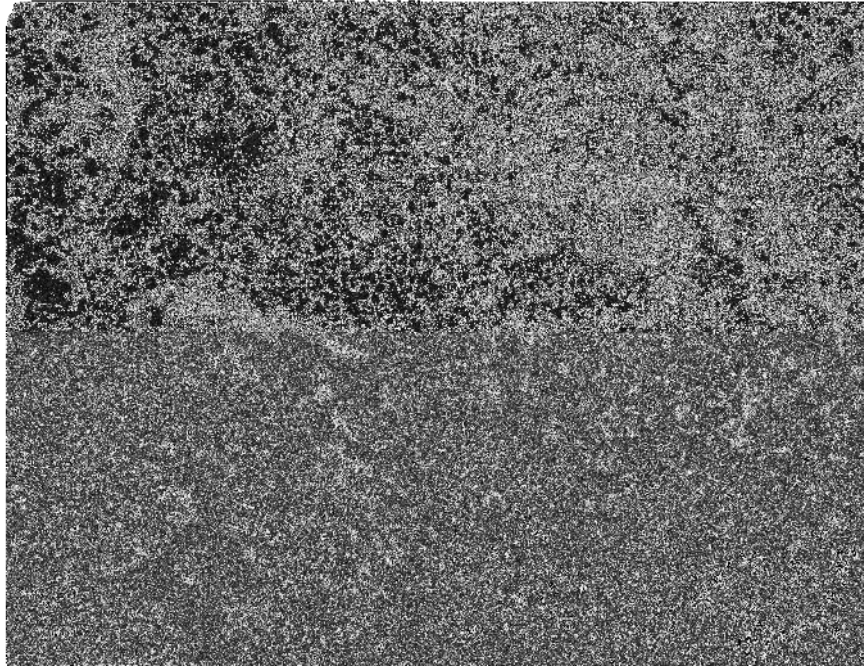


Figura 17 - cultura de células 293 no 4º dia pós-transfecção. Ausência de efeito citopático. 40X.

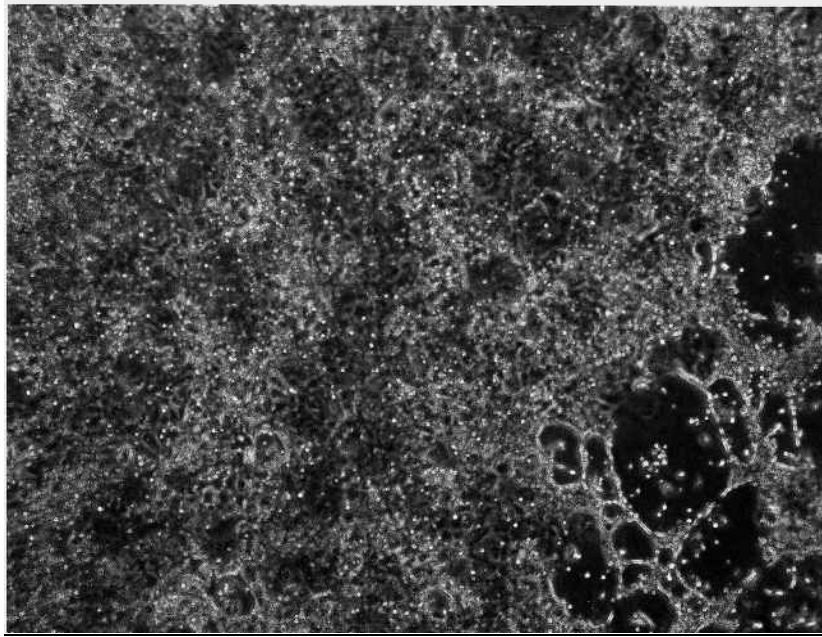


Figura 18 - cultura de células 293 no 6º dia pós-transfecção. Efeito citopático inicial.

40X.

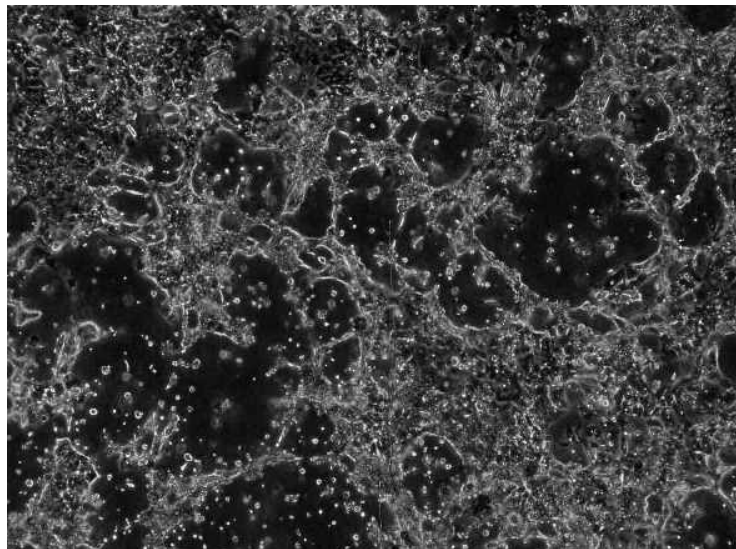


Figura 19 - cultura de células 293 no 10º dia pós-transfecção. Efeito citopático completo.

40X.

3.7.2. Purificação e quantificação viral

A etapa seguinte, de purificação viral, foi iniciada pela centrifugação de debris celulares coletados dos poços positivos para o efeito citopático. O material foi coletado em tubos plásticos estéreis de 50 ml e centrifugados a 7.000 rpm, a 4°C, por 5 min. Em seguida, o sedimento foi submetido a 3 ciclos consecutivos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho maria a 37°C). Após nova etapa de centrifugação a 13.200 rpm, o sobrenadante - ao qual nos referimos nessa fase como lisado viral cru (L.V.C.) - foi coletado para posterior pesquisa de proteína recombinante pela técnica de "immunoblotting". Seguiu-se a infecção de novas células 293 em frascos de culturas com 96 poços inoculadas com uma diluição de 10^{11} do L.V.C. Após 5 dias, observamos novamente o efeito citopático característico, correspondente a uma única unidade formadora de placa (**p.f.u.**). Após essa etapa, executamos a seleção de clones, utilizando 5 ml de L.V.C. provenientes de cada poço positivo para efeito citopático através da técnica de *immunoblotting*, descrita na **seção 3.6.3**. Foram detectados 7 clones expressando a proteína HA-A1ΔTM. O clone #14 foi escolhido para as etapas posteriores de purificação e amplificação viral, descritas a seguir.

Inoculamos 20 frascos triplos de culturas de 100 cm² (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca), contendo células 293 confluentes a 90%, com o sobrenadante do L.V.C. do clone #14. Após um período de observação de 5 dias, pudemos constatar o efeito citopático característico em todos os frascos. Debris celulares foram novamente coletados em fracos de 50 ml e centrifugados a 7.000 rpm a 4°C por 5 min, conforme descrito acima. O L.V.C. provenientes destas células foi então submetido a 2 etapas de ultra-centrifugação por 1 h a 48.000 rpm, a 20°C, em ultra-centrífuga modelo Beckman L-

8 M (Beckman Inc., E.U.A.), misturando-se 5 ml do sobrenadante, 3 ml de 1.45 g/cm³ CsCl e 3 ml de 1.33 g/cm³ CsCl, utilizando-se uma seringa com agulha 19G para evitar a formação de bolhas de ar. Após essa etapa de ultra-centrifugação pudemos observar a formação de 2 camadas, visíveis a olho nú, correspondentes aos capsídeos virais vazios (camada superior) e ao vírus íntegro (camada inferior). Após aspiração da camada correspondente ao vírus íntegro procedemos a nova ultra-centrifugação do conteúdo diluído em 8 ml de 1.33 g/cm³ de CsCl a 63.000 rpm por 3 horas. Como resultado dessa nova etapa pudemos detectar uma única camada correspondendo ao vírus purificado. A etapa final do processo de purificação consistiu da aspiração dessa camada, diluição em glicerol estéril a 10% e, finalmente, a uma diálise do conteúdo em micro-câmara contra 1 l de dialisado (Tris 10 mM pH 7.4, 1 nM MgCl₂ in 1 X PBS) a 4°C. composto Tris 10 mM pH 7.4, 1 nM MgCl₂ in 1 X PBS. O objetivo desta última etapa de purificação é o de eliminar eventuais resíduos de CICs aspirados juntamente com o vírus.

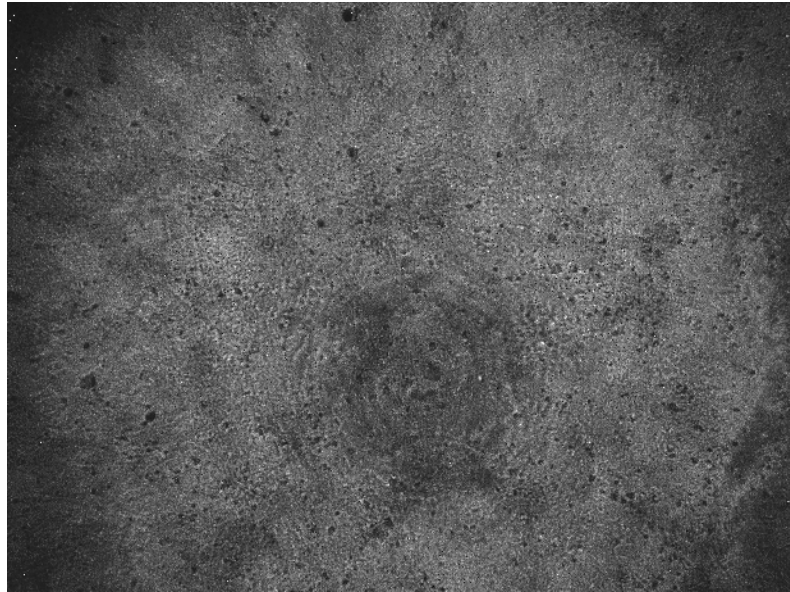


Figura 20 – Titulação viral em frascos de cultura (96 poços) de células 293. Dia 1 pós-inoculação. Ausência de efeito citopático. X 40.

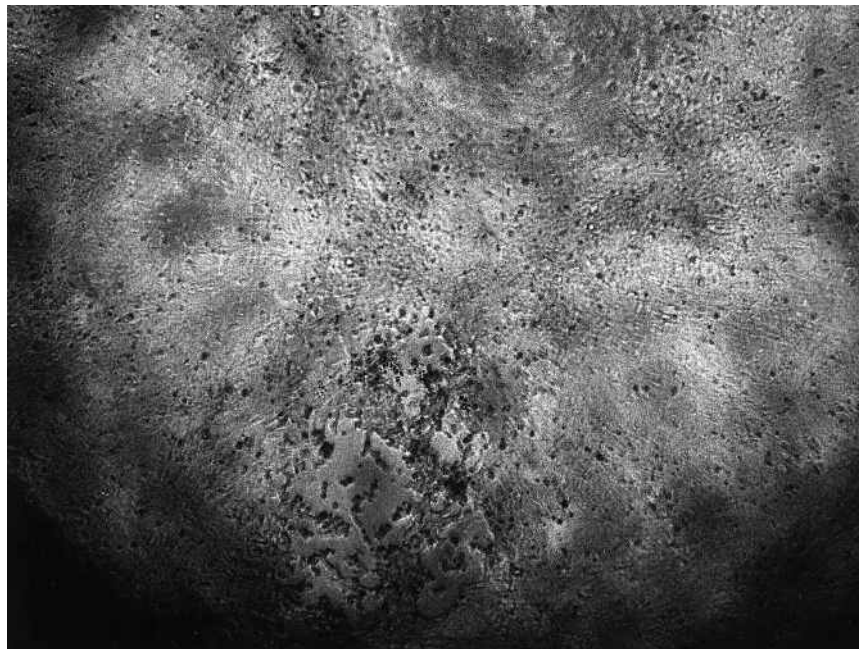


Figura 21 – Titulação viral em frascos de cultura (96 poços) de células 293. Dia 4 pós-inoculação. Efeito citopático inicial. X 40.

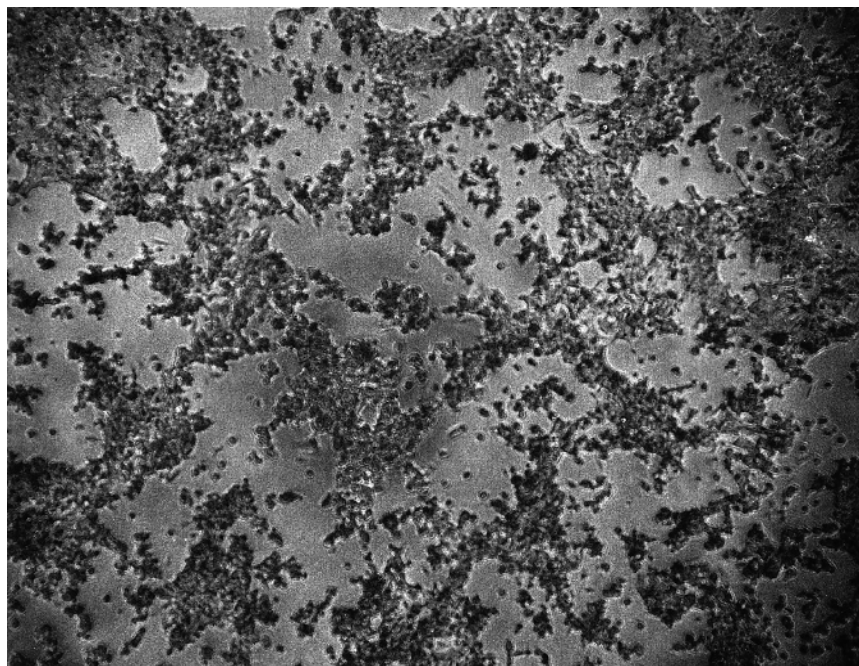


Figura 22 – Titulação viral em frascos de cultura (96 poços) de células 293. Dia 5 pós-inoculação. Efeito citopático pleno. X 40.

Após as etapas de purificação realizou-se a quantificação viral, através da técnica de diluição em frascos de cultura com 96 poços. Cada frasco foi inoculado com 1 μ l da solução viral purificada, diluída 10^9 , 10^{10} , 10^{11} e 10^{12} vezes em DMEM contendo 1% de SFB. Após o 4º dia de inoculação, contamos o número de poços apresentando efeito citopático e calculamos a concentração da solução original em 4×10^{11} / μ l.

3.7.3. Infecção de CE com rAd.A1 Δ TM

CE provenientes de aorta de porco (PAEC) foram cultivadas, como descrito na **seção 3.1.1**. PAEC em cultura foram infectadas, ao atingirem 90% de confluência, com concentrações crescente (0 a 500 p.f.u.) de rAd.A1 Δ TM ou de um adenovírus

recombinante expressando a proteína β -galactosidase (rAd. β -gal), construído previamente no mesmo laboratório. Até 1 h e 30 min após a inoculação, as PAEC mantidas em meio DMEM contendo 1% SFB, suplementado com 125 U/ml de penicilina, estreptomicina (125 mg/ml) e 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.). Após esse período adicionamos SFB inativado por calor, até atingir-se a concentração de 10%. O meio de cultura foi trocado na manhã seguinte e as células em cultura permaneceram em repouso em estufa contendo CO₂ a 5%, a 37°C, por mais 24 horas, quando foram então submetidas à pesquisa de proteína A1 recombinante pela técnica de *immunoblotting*, conforme descrito na **seção 3.6.3**.

3.7.4. Imuno-histoquímica

A expressão de proteína HA-A1 Δ TM resultante da transferência mediada por rAd.A1 Δ TM em PAEC foi também confirmada pela técnica de imuno-histoquímica, em CE centrifugadas em lâminas (*cytospins*), de acordo com o seguinte protocolo:

3.7.4.1. Coleta de CE

Quarenta e oito horas após a infecção de PAEC com o adenovirus recombinante rAd.A1 Δ TM, ou com o adenovirus controle rAd. β -gal, lavamos as placas de cultura celular com 2 ml de PBS 1X e raspamos delicadamente as CE, com o auxílio de uma régua de borracha. Em seguida, suspendemos as CE em PBS na concentração de $2 \cdot 10^5$ células/ml.

3.7.4.2. Cytospins e fixação celular

Amostras da solução contendo PAEC suspensas em PBS (2×10^5 células/ml) foram depositadas em cubas sobre laminas de vidro (2 X 200 μ l/lâmina) e centrifugadas no equipamento tipo *Cytospin 3* (Shandon Lipshaw, Pittsburgh, PA, EUA) durante 7 min a 1.000 rpm. Imediatamente após a centrifugação, as laminas foram fixadas com solução de isopropanol a 64% e polioxietileno a 15% e deixadas expostas na bancada para secagem em ar ambiente. Em seguida as laminas foram fixadas com solução de acetona a 90% e formaldeído a 10% a 4°C por 2 min.

3.7.4.3. Immunoblotting

Após a etapa de fixação, as laminas contendo CE foram lavadas por duas vezes com solução salina fosfatada (PBS) e expostas a solução salina albuminada a 5% por 30 min. Em seguida, foram incubadas em câmara úmida, por 1h, com o primeiro anticorpo - monoclonal de rato anti-HA (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemanha) diluído 1:100 em PBS – ou com um anticorpo controle tipo IgG de rato não específica, nas mesmas condições. Após lavagem com PBS durante 10 min, as laminas foram expostas ao segundo anticorpo - IgG (H + L) de cabra anti-rato, biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, E.U.A.) - por 1 h, na diluição 1:100. Seguiu-se nova lavagem com PBS e as etapas de exposição ao complexo avidina-biotina por 30 min e revelação com o complexo diaminobenzeno (DAB), (Vector, Burlingame, E.U.A). Após a etapa de revelação, analisamos a expressão nas CE de proteína A1 Δ TM à m.o. (células marcadas em marrom), comparando os grupos r.Ad.A1 Δ TM e controle r.Ad. β -gal).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados nesse estudo são produto da execução de pelo menos 3 experimentos, realizados em triplicatas.

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student (dados paramétricos), e estão expressos em valores de média \pm erro padrão.

Para a confecção dos gráficos, utilizamos o programa *Cricket Graph® for Macintosh*.

Foram consideradas significativas as diferenças com valor de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *A1* EM CE

4.1.1. Expressão de proteína *A1* e de proteínas recombinantes *A1* em CE

Níveis significativos de proteína *A1* e mutantes ($A1\Delta m$) foram detectados em BAEC, 48 h após a transferência genética mediada por lipossomas catiônicos, através da técnica de *immunoblotting* (**Figura 23**).

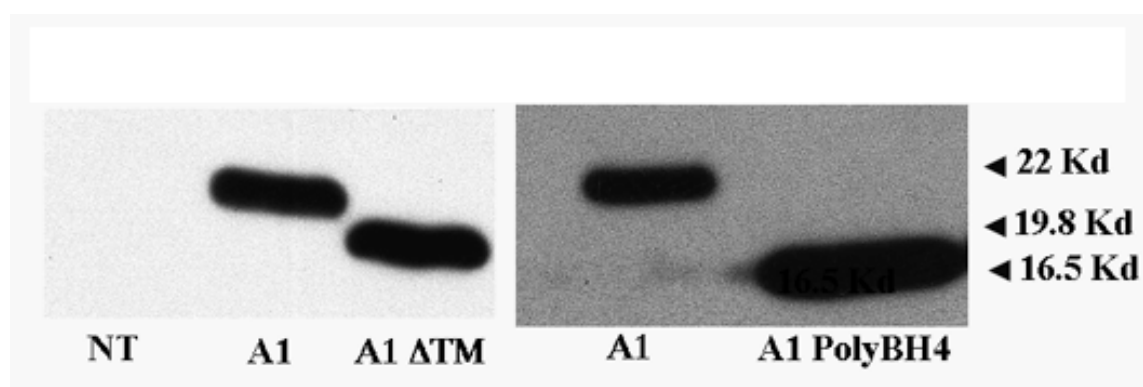


Figura 23 – Expressão de proteína *A1* e mutantes ($A1\Delta$ TM, $A1$ polyBH4) em BAEC, 48 h após a transferência genética mediada por lipossomas catiônicos. NT= CE não transfectadas (controle negativo). *Immunoblotting*, eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%.

4.1.2. Função anti-inflamatória do gene *A1* transferido para CE

Com o objetivo de avaliar o efeito da transferência do gene *A1* sobre a ativação NF- κ B em CE, utilizamos o plasmídeo repórter NF- κ B/luciferase como revelador de inflamação destas células, conforme descrito na **seção 3.5.2**. BAEC foram co-transfectadas com 0,65 μ g/poço do repórter NF- κ B/luciferase e 0,7 μ g/poço do plasmídeo de expressão pAC.HA-A1 ou do vetor pAC (grupo controle). Quarenta e oito horas após a transferência genética, BAEC foram estimuladas por 7 h com TNF (200 UI/ml). Em seguida, as células foram coletadas para análise de atividade enzimática de luciferase e β -galactosidase através de quimioluminescência.

A atividade enzimática basal em BAEC transfectadas com o plasmídeo controle (pAC) foi de 7 ± 1 u.r.l. Após o estímulo com TNF, a atividade mensurada neste grupo controle foi de 151 ± 23 u.r.l. (**Figura 24**). A co-expressão de proteína HA-A1 inibiu significativamente a ativação do repórter NF- κ B induzida por TNF em BAEC, que passou de 5 ± 0 u.r.l. (basal) para 54 ± 15 u.r.l. (pós-estímulo), conforme demonstrado na **Figura 24**.

Esses resultados demonstram que o gene *A1* transferido para células endoteliais exerce uma função anti-inflamatória, através da inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B.

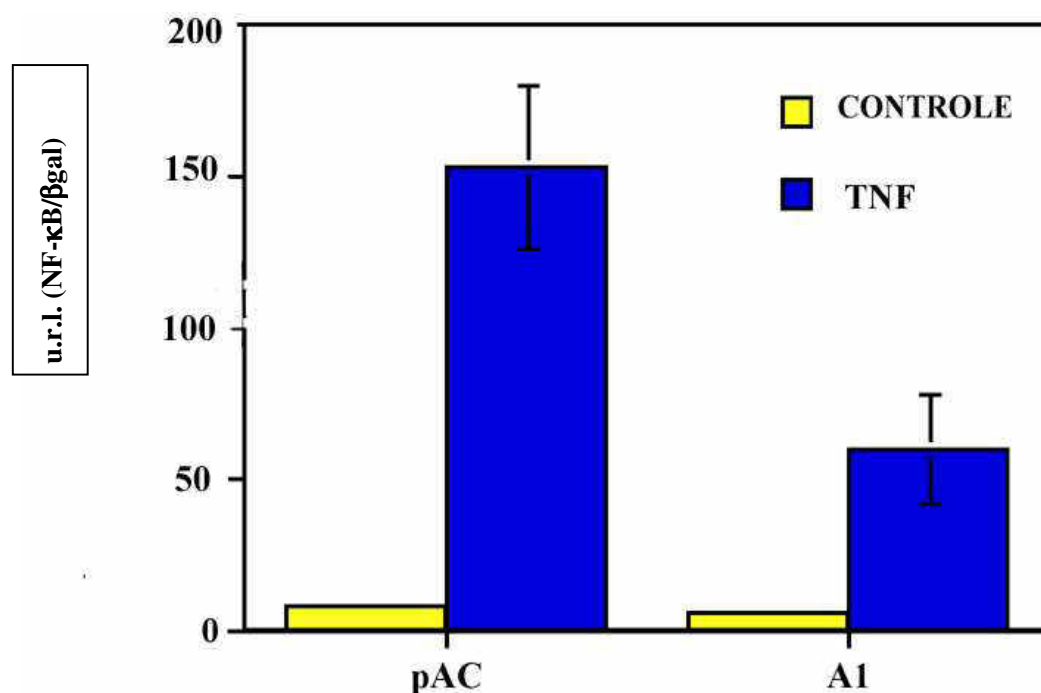


Figura 24 – Efeito da transferência do gene *A1* sobre a ativação do repórter NF-κB induzida por TNF (200 UI/ml) em BAEC. $P < 0,05$. **u.r.l.** = unidades relativas de luminescência.

4.1.3. Função anti-apoptótica do gene *A1* transferido para CE

Após a confirmação da expressão protéica HA-A1 em BAEC submetidas a transferência genética mediada por lipossomas catiônicos, testamos o efeito protetor do gene *A1* sobre a apoptose induzida por TNF, em células tratadas com CHX, conforme descrito na seção **3.5.3**. BAEC foram co-transfectadas com 1 µg/poço dos plasmídeos de expressão pAC (controle) ou pAC.HA-A1, além do plasmídeo repórter RSV-β-gal (0,4 µg/poço). Após 48 h de transferência genética, BAEC foram estimuladas com TNF (200 UI/ml).

Dezesseis horas após o estímulo, pudemos constatar a morte de $84 \pm 4\%$ das células no grupo controle (**Figura 25**). A expressão da proteína HA-A1 conferiu significativa proteção contra a apoptose induzida por TNF, conforme demonstrado pela viabilidade de $63 \pm 12\%$ de células no grupo A1 (**Figura 25**). Esses resultados confirmam que, à semelhança dos genes *bcl-2* e *bcl-x_L*, o gene *A1* transferido para células endoteliais é capaz de inibir a apoptose induzida por TNF/CHX, através de mecanismos ainda não estabelecidos.

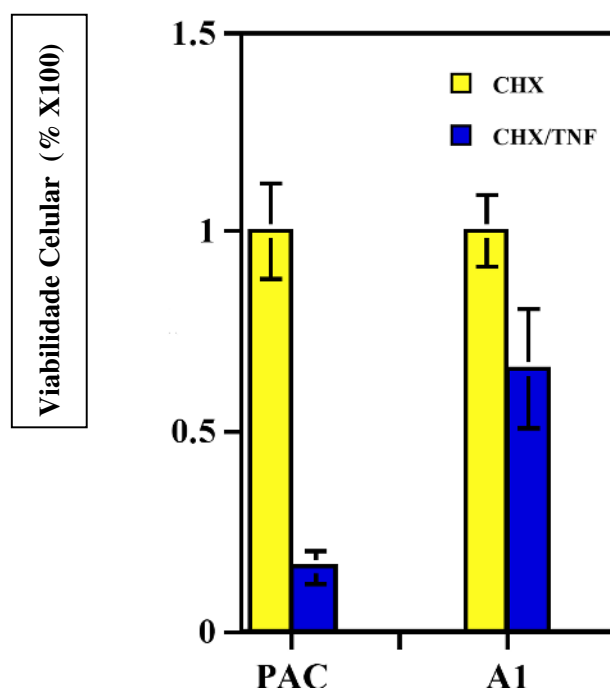


Figura 25 – Efeito da transferência do gene *A1* sobre a apoptose induzida por CHX/TNF em BAEC; $P < 0,05$.

4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENE *A1* EM CE

4.2.1. Construção de mutantes do gene *A1* e expressão em CE

Análises estruturais da família de genes Bcl-2 demonstraram que são providos de um domínio hidrofóbico transmembrana (TM) em sua porção carboxi-terminal, responsável pelo ancoramento da proteína à membrana mitocondrial e outras organelas [KRAJEWSKI *et al.*, 1993]. Acredita-se que essa função de ancoramento seja fundamental para a função anti-apoptótica exercida pela proteína A1 [DURIEZ *et al.*, 2000]. Entretanto, estudos realizados em outros genes anti-apoptóticos da mesma família, demonstraram que a função anti-apoptótica de *bcl-2* e *bcl_x* pode ser exercida na ausência do mesmo domínio [HUNTER, BOND, PARSLOW, 1996; BADRICHANI *et al.*, 1999]. Com o objetivo de analisar o papel do domínio TM da proteína A1 nas funções anti-apoptótica e anti-inflamatória em CE, construímos um mutante com deleção dirigida para tal domínio, inserido posteriormente no plasmídeo de expressão pAC (pAC.A1ΔTM), conforme descrito na **seção 3.2.3**.

Também questionamos o papel do domínio BH4 do gene *A1* nas funções anti-apoptótica e anti-inflamatória em CE, já que o mesmo domínio encontra-se presente em todos os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 e ausente dos genes pró-apoptóticos da mesma família (**Figura 6**), [HUNTER, BOND, PARSLOW, 1996; de MOISSAC, ZHENG, KIRSHENBAUM, 1999]. Nesse sentido, utilizando a técnica de OLE-PCR, construímos um mutante de *A1* desprovido do domínio BH4, inserindo-o posteriormente no plasmídeo de expressão pAC (pAC.A1ΔBH4), conforme descrito na **seção 3.2.3**. Finalmente, com o objetivo de analisar a função isolada do mesmo domínio em CE, construímos um

plasmídeo de expressão codificando o domínio BH4 em sequência repetida por 4 vezes (pAC.HA-polyBH4).

A expressão protéica correspondente aos diferentes mutantes do gene A1, 48 h após a transferência mediada por lipossomas catiônicos para BAEC, foi confirmada por *immunoblotting*, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HA (**Figura 26**).

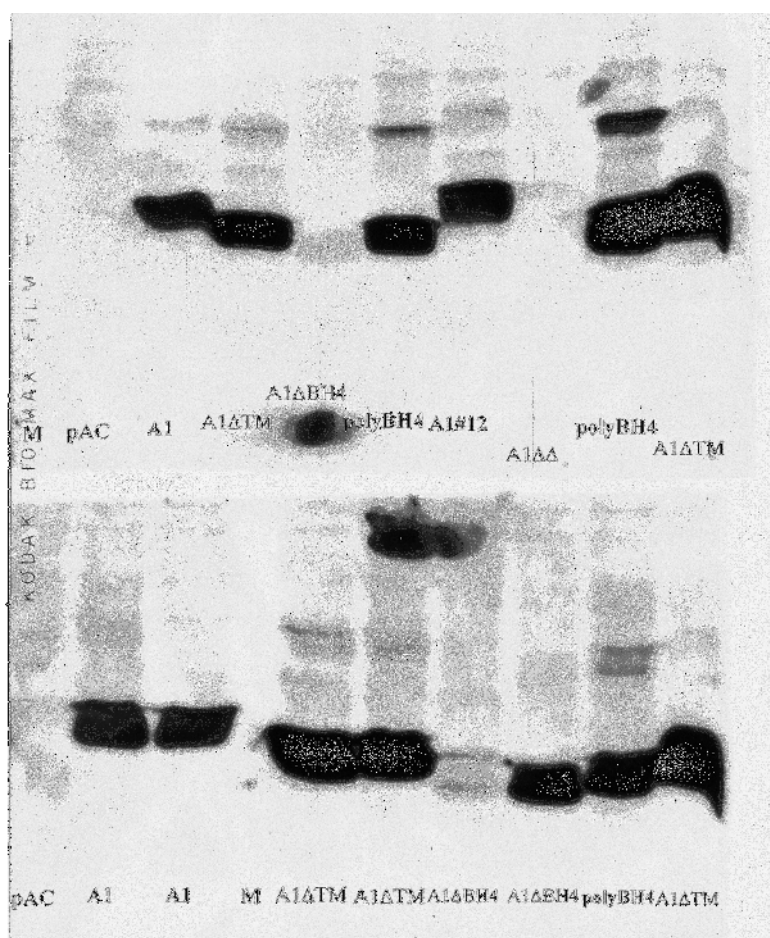


Figura 26 – Expressão de proteína recombinante de mutantes do gene A1 (HA-A1Δm) em BAEC, 48 h após transferência genética mediada por lipossomas catiônicos. pAC=controle negativo; A1=gene A1 íntegro; A1ΔTM=deleção do domínio TM; A1ΔBH4=deleção do domínio BH4; polyBH4=sequência codificando o domínio BH4 (4X). *Immunoblotting*; eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%.

4.2.2. Papel do domínio BH4 na função anti-inflamatória de A1 em CE

A atividade inibitória sobre a ativação NF- κ B exercida pelos diferentes mutantes de A1 foi analisada, 48 h após a transferência genética mediada por lipossomas catiônicos.

BAEC transfectadas com os plasmídeos pAC (grupo controle), pAC.HA-A1 Δ TM e pAC.HA-A1 Δ BH4 foram submetidas a estimulação por TNF (200 UI/ml) durante 7 h. Em seguida, lisados celulares foram coletados para avaliação de atividade enzimática de luciferase e β -galactosidase, conforme descrito na seção 3.5.2.1. Como foi demonstrado acima (**Figura 24**), a estimulação com TNF levou à indução do repórter NF- κ B. A co-expressão da proteína A1 privada do domínio TM (pAC.HA-A1 Δ TM) inibiu significativamente a indução de atividade de luciferase de 179 ± 2 u.r.l. para 47 ± 4 u.r.l. (**Figura 27**). No entanto, a deleção do domínio BH4 de A1 resultou na redução significativa (143 ± 9 u.r.l.) da função inibitória da proteína A1 sobre a ativação do repórter NF- κ B induzida por TNF (**Figura 27**).

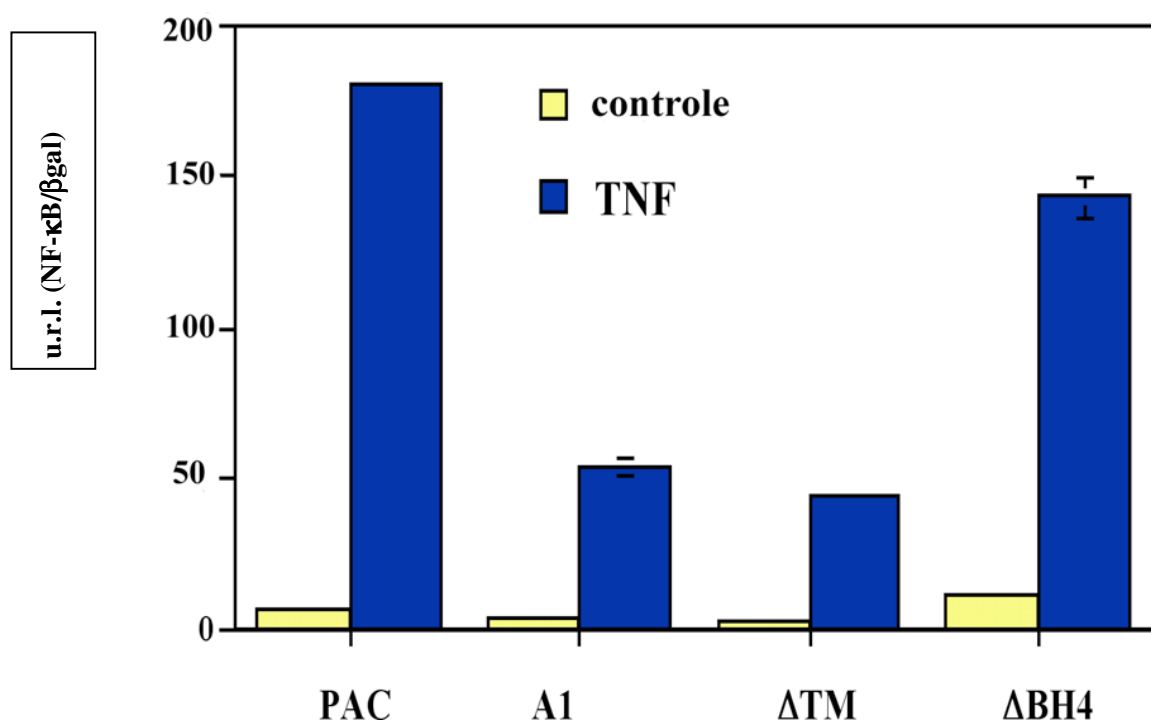


Figura 27 – Efeito da deleção dos domínios TM e BH4 da proteína A1 sobre a inibição da ativação do repórter NF- κ B em BAEC estimuladas por TNF (200 UI/ml); $P < 0,05$.

u.r.l. = unidades relativas de luminescência.

Esses resultados demonstram que o domínio TM não é necessário para a função anti-inflamatória de A1 em células endoteliais. Entretanto, o domínio BH4 de A1 é essencial para a inibição da ativação de NF- κ B em CE estimuladas por TNF.

A confirmação destas conclusões pode ser obtida através da expressão isolada do domínio BH4 (polyBH4) em BAEC, que inibiu significativamente (de 151 ± 27 u.r.l. para 41 ± 4 u.r.l.) a indução do repórter NF- κ B em BAEC estimuladas por TNF, em nível comparável ao do gene A1 íntegro, (**Figura 28**).

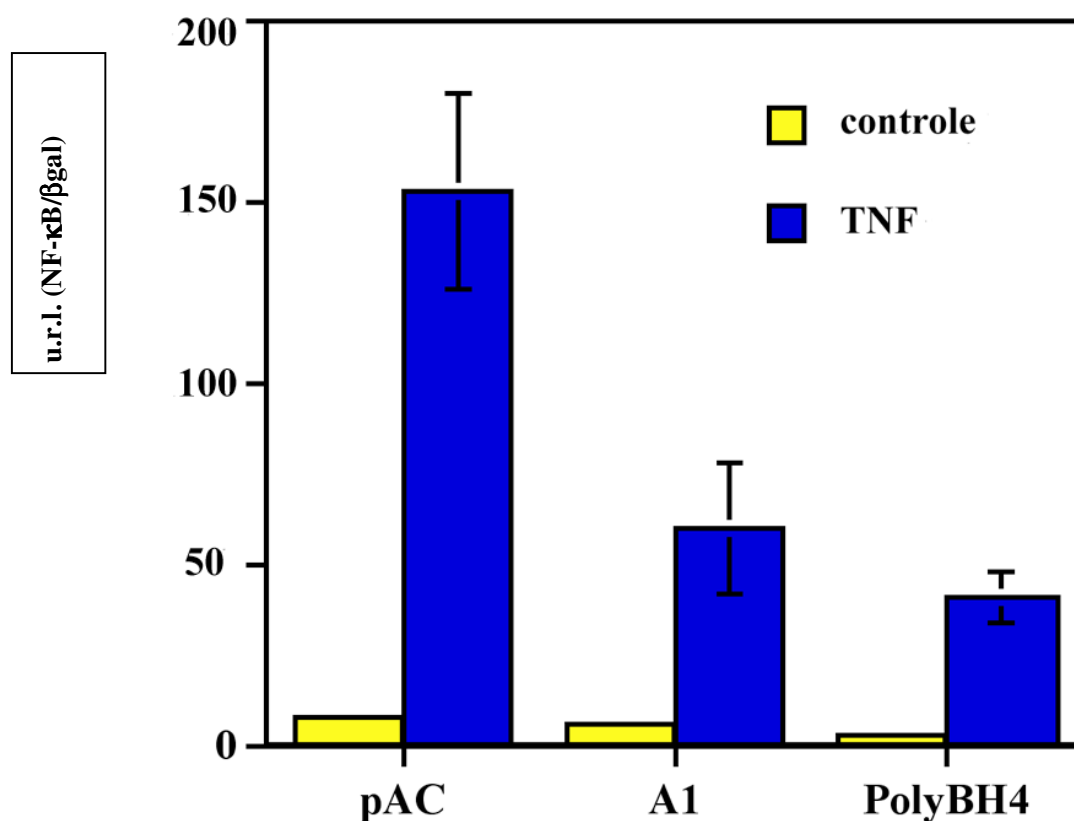


Figura 28 – Efeito da expressão isolada do domínio BH4 sobre a ativação do repórter NF-κB em BAEC ativadas por TNF; $P < 0,05$. **u.r.l.** = unidades relativas de luminescência.

Analisados em conjunto, esses resultados demonstram que o domínio BH4 é necessário e suficiente para a execução da função anti-inflamatória de *A1*, através da inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB, em células endoteliais.

4.2.3. Papel do domínio BH4 na função anti-apoptótica de *A1* em CE

Avaliamos também o papel protetor exercido pelos diferentes mutantes de *A1* na prevenção de apoptose induzida por TNF (200 UI/ml), em CE tratadas com CHX (2 µg/ml).

BAEC foram transfectadas com os plasmídeos pAC (controle), pAC.HA-A1ΔTM ou pAC.HA-A1ΔBH4, pela técnica de lipossomas catiônicos, conforme descrito na seção

3.5.3.1.

O tratamento com CHX seguido de TNF induziu apoptose em níveis comparáveis nos grupos controle e A1 ΔBH4 (15,7±4,3% e 16,4±5,7% de viabilidade celular, respectivamente), demonstrando que o domínio BH4 é necessário para a função anti-apoptótica do gene *A1* em CE (**Figura 29**). A deleção do domínio TM não interferiu com a função anti-apoptótica do gene *A1*, já que observamos níveis comparáveis de viabilidade celular entre os grupos pAC.A1 (65,5±10,5%) e pAC.HA-A1ΔTM (65,4±5,3%), (**Figura 29**).

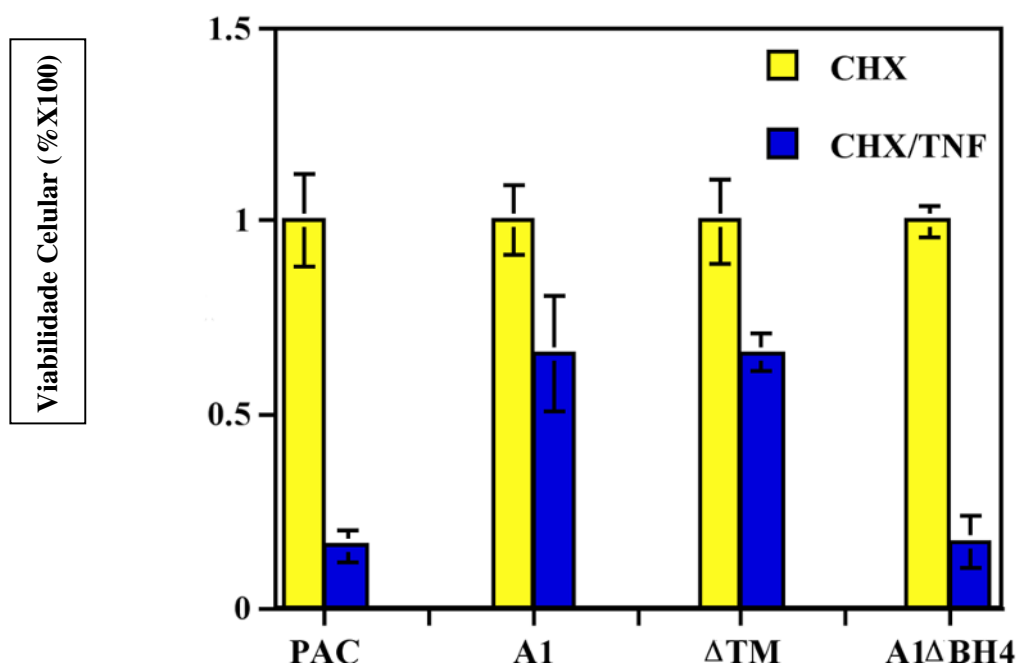


Figura 29 – Efeito da deleção dos domínios TM e BH4 sobre a função anti-apoptótica de A1 em BAEC tratadas com CHX (controle) ou CHX/TNF; $P < 0,05$ comparando-se os grupos pAC vs. A1 e pAC vs. Δ TM. $P = \text{N.S.}$ comparando-se os grupos pAC vs. A1 Δ BH4.

4.3. TRANSFERÊNCIA, MEDIADA POR ADENOVÍRUS, DO GENE *A1* PARA CE

Com a finalidade de obtenção de níveis elevados de expressão protéica em CE, construímos um adenovírus recombinante codificando o gene *A1*, deletado de seu domínio TM (r.Ad.A1 Δ TM), conforme descrito na **seção 3.7.1**. Após a transferência genética mediada por esse vírus, verificamos a expressão protéica utilizando as técnicas de *immunoblotting* e de imuno-histoquímica.

4.3.1. Immunoblotting

Níveis progressivos de expressão protéica foram detectados por *immunoblotting* em PAEC, de acordo com a concentração de r.Ad utilizada, expressa em unidades formadoras de placa (pfu), variando de zero a 500 pf.u/célula (**Figura 30**).

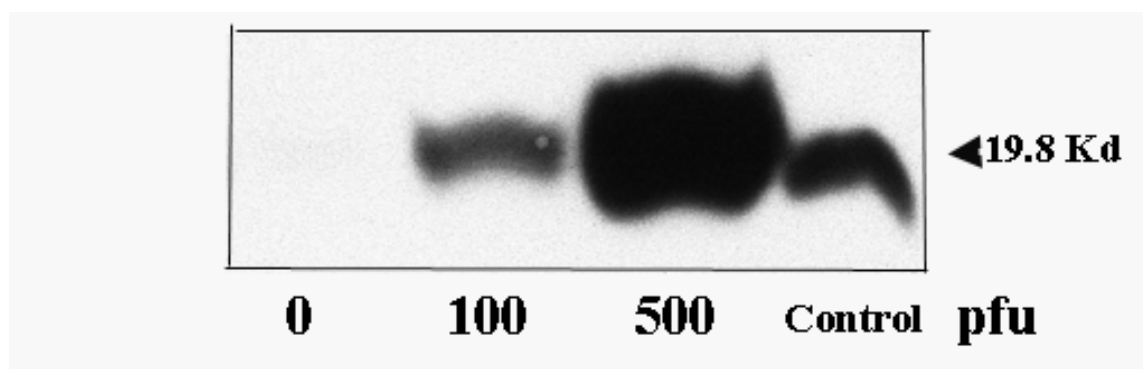
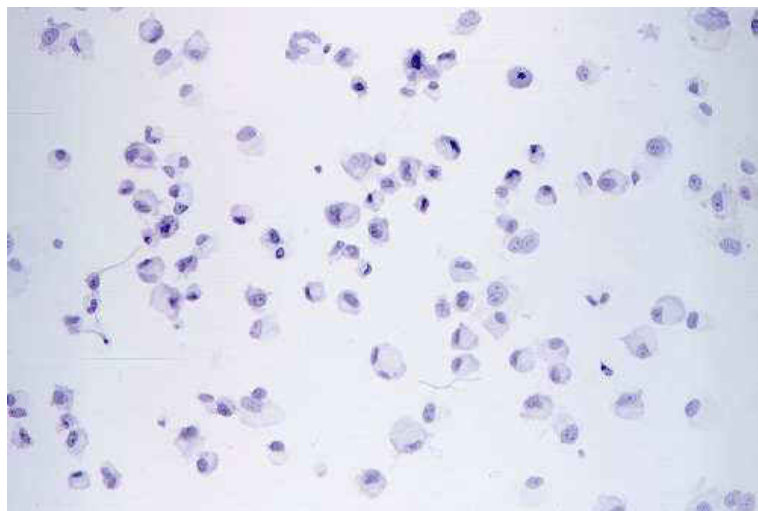


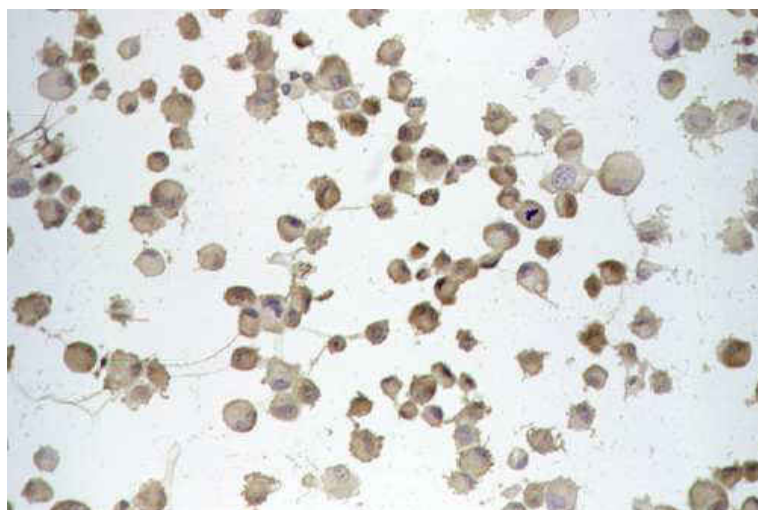
Figura 30 – Expressão de proteína HA-A1 Δ m em PAEC, 48 h após transferência genética mediada por adenovírus (r.Ad.A1 Δ TM) . *Immunoblotting*; eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. Pfu = unidades formadoras de placas.

4.3.2. Imuno-histoquímica

A expressão protéica recombinante (HA-A1 Δ TM), após a transferência genética mediada por adenovírus, também pode ser confirmada por imuno-histoquímica, em aproximadamente 100% das células endoteliais expostas (PAEC). A especificidade do anticorpo monoclonal utilizado (anti-HA) é demonstrada pela ausência de células positivas no grupo controle (r.Ad. β -gal), quando comparadas com o grupo r.Ad.A1 Δ TM. A técnica de imuno-histoquímica nos permite observar a expressão da proteína A1 transgênica predominantemente citoplasmática, conforme demonstrado na **Figura 31**.



A



B

Figura 31 – Expressão de proteína HA-A1Δm em PAEC, 48 h após transferência genética mediada por adenovírus (rAd.A1ΔTM). A) rAd.β-gal (controle); B) rAd.A1ΔTM. Imuno-peroxidase. 100X.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apoptose e ativação de células endoteliais são fenômenos biológicos comumente observados em diferentes condições patológicas, tais como: rejeição aguda e crônica de enxertos, vasculites, sepse e síndrome hemolítico-urêmico [COTRAN & POBER, 1989; LAINE *et al.*, 1997; BRADLEY, WILKS, RUBENSTEIN, 1994]. Numerosos estudos, utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que estímulos diversos podem induzir a ativação e/ou apoptose em CE; privação de hormônios de crescimento, exposição a venenos de cobras, inibição de crescimento celular dependente de ancoramento e exposição a substâncias pró-inflamatórias endógenas ou exógenas (TNF, IL-1, LPS, etc.) são exemplos de fenômenos capazes de induzir as alterações fenotípicas que caracterizam as CE ativadas e, em alguns casos, induzir a morte celular programada [ARAKI *et al.*, 1990; ARAKI *et al.*, 1993; ROBAYE *et al.*, 1991; POLUNOVSKY *et al.*, 1994; HAIMOVITZ *et al.*, 1997].

O fator de necrose tumoral alfa (TNF) é a principal citocina detectada em sítios de inflamação, tendo sido demonstrado capaz de induzir inflamação e apoptose em diferentes tipos celulares, através de vias de sinalização bem caracterizadas. Estudos de ativação do receptor de TNF do tipo 1 (TNF-R1) demonstraram que o TNF promove a trimerização destes receptores a nível de membrana celular, promovendo a ativação de sítios intra-celulares específicos, denominados domínios da morte (**Figura 4**). A ativação do domínio da morte associado ao receptor TNF (TRADD) inicia a cascata de sinalização que leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B [HSU, XIONG, GOEDEL, 1995], enquanto a ativação do domínio de morte associado ao receptor CD95/Fas (FADD) sinaliza para a ativação de caspases, que iniciam o processo de ativação da via apoptótica [CHINNAIYAN *et al.*, 1995]. A relação entre as diferentes vias de sinalização intra-celular começa, aos poucos, a ser estabelecida (**Figura 32**).

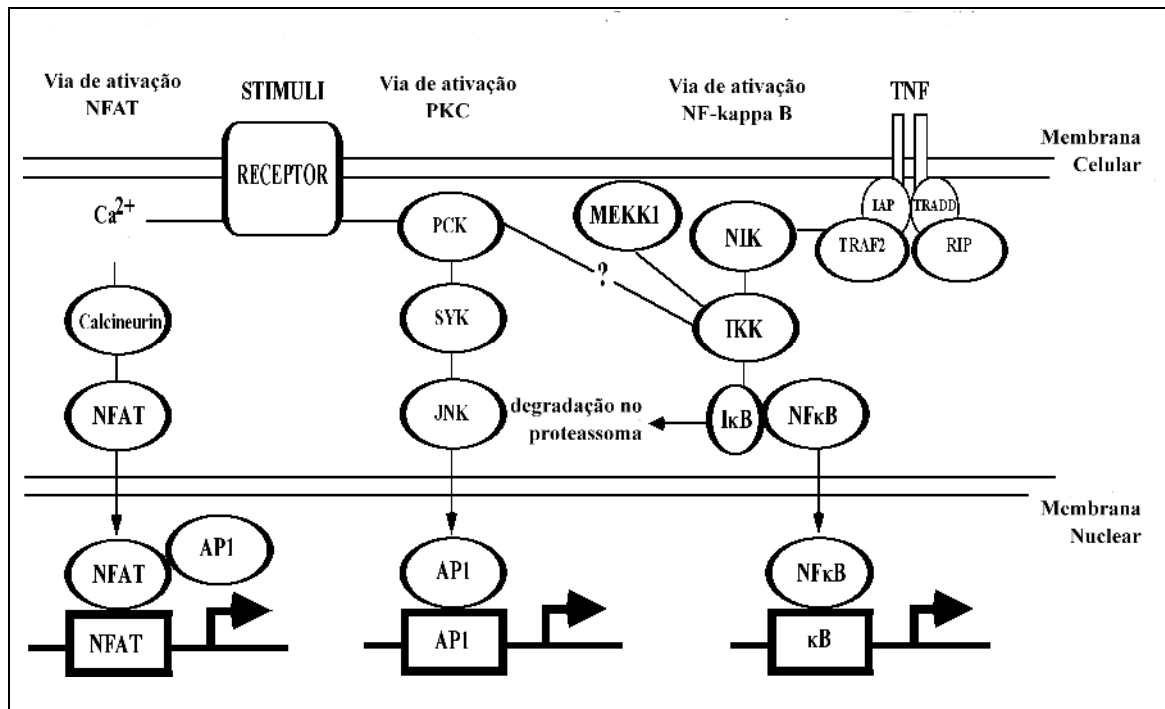


Figura 32 – Ativação do receptor de TNF do tipo 1 (TNF-R1) e vias de sinalização intra-celular.

O receptor de TNF do tipo I (TNF-RI) é expressado na superfície de CE em diferentes espécies animais, onde executa uma função crucial no processo de ativação destas células, através da ativação do fator de transcrição NF- κ B [READ *et al.*, 1994]. Habitualmente resistentes à apoptose induzida por TNF, CE tornam-se sensíveis à morte celular programada na presença de inibidores de síntese protéica, tais como cicloheximida (CHX) ou actinomicina D, demonstrando que a expressão *de novo* de um ou mais genes induzíveis é essencial para a proteção destas [DIXIT *et al.*, 1990].

Estudos prévios, realizados no mesmo laboratório, haviam demonstrado que os genes anti-apoptóticos *A20* e alguns genes da família Bcl-2 (*bcl-2*, *bcl-x_L* e *A1*) exercem um papel de dupla proteção em CE. Além de bloquearem a via apoptótica, através de mecanismos ainda não estabelecidos, estes genes exercem uma ação anti-

inflamatória em CE, via inibição de ativação do fator de transcrição NF- κ B [BADRICHANI, 1999; STROKA, 1999].

Contrastando com os genes *bcl-2* e *bcl-x_L*, que são expressos de forma constitutiva em CE, os genes *A1* e *A20* apresentam níveis de expressão praticamente indetectáveis em CE quiescentes, expressando-se de forma induzida após estimulação com citocinas pró-inflamatórias [COOPER *et al.*, 1996; KARSAN, YEE, HARLAN, 1996]. Essas características permitiram Ferran e cols. classificar os genes *A1* e *A20* na categoria de "genes protetores induzíveis", sugerindo que sua principal função nas CE seria a de *down-regulation* da expressão de genes associados ao fenótipo da CE ativada [BACH, HANCOCK, FERRAN, 1997].

O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a expressão supra-fisiológica de genes anti-apoptóticos em CE, obtida através de transferência genética, é capaz de inibir a ativação de CE induzida por diferentes estímulos, tais como TNF, IL-1, H₂O₂, trombina e LPS, dentre outros. Utilizando genes repórteres específicos, incluindo promotores de E-seletina, IL-8 e I κ B α como reveladores, os autores demonstraram que a expressão de *A20* ou dos genes anti-apoptóticos *bcl-2* ou *bcl-x_L* transferidos para CE pela técnica de lipossomas catiônicos revelou-se como estratégia eficaz para a inibição da expressão de genes associados à ativação de CE [COOPER *et al.*, 1996; FERRAN *et al.*, 1998].

O gene *A1* foi inicialmente reconhecido por suas propriedades anti-apoptóticas em linhagens hematopoiéticas, sendo posteriormente detectado em tumores gástricos [LIN *et al.*, 1993; CHOI *et al.*, 1995]. Inicialmente classificado como gene de resposta rápida após estimulação por GM-CSF, o gene *A1* teve seu papel valorizado após a confirmação de sua participação no processo de regulação de maturação intra-tímica de linfócitos T [LIN *et al.*, 1996; CARRIÓ *et al.*, 1998]. A importância da expressão do gene *A1* também foi ressaltada pela sua necessidade para a sobrevivência de linfócitos

B maduros estimulados por CD40 ou por complexo antígeno-anticorpo [LEE *et al.*, 1999]. Outros estudos demonstram que neutrófilos expressam o gene *A1* de forma constitutiva, além de terem sua expressão induzida após estímulo com G-CSF ou LPS [LIN *et al.*, 1993; HU *et al.*, 1998]. A expressão de *A1* em macrófagos tem as mesmas características [NOBLE *et al.*, 1999]. Neutrófilos de camundongos que não expressam *A1-a*, um sub-tipo do gene identificado nesses animais, apresentam apoptose acelerada como resposta à exposição a LPS ou após migração trans-endotelial [HAMASAKI *et al.*, 1998]. Em conjunto, esses achados sugerem que o gene *A1* protege as CE, neutrófilos e células mononucleares contra apoptose nos sítios de reação inflamatória.

Em CE, o gene *A1* é induzido por uma via dependente de proteína quinase C (PKC), em resposta a estímulos pró-inflamatórios tais como TNF, LPS e IL-1, exercendo proteção celular contra apoptose induzida por ceramidas [KARSAN, YEE, HARLAN, 1996]. Além dos mediadores solúveis, a expressão de *A1* em CE também pode ser induzida pelo contato célula/célula, conforme demonstrado em estudos utilizando co-culturas de monócitos e CE [NOBLE *et al.*, 1999]. Tal achado sugere que a migração trans-endotelial de monócitos em locais de inflamação aguda e crônica envia sinais para CE levando à proteção contra a morte celular e preservando, dessa forma, a integridade micro-vascular. É possível que fatores de crescimento vascular, tais como FGF ou VEGF, também possam induzir a expressão do gene *A1* em CE, porém esta hipótese ainda não foi demonstrada de forma consistente [GERBER, DIXIT, FERRARA, 1998; NOR *et al.*, 2001].

Stroka e cols. [1999], trabalhando no mesmo laboratório, demonstraram que a expressão induzida de *A1* em CE em resposta a estímulos pró-inflamatórios, é dependente da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Curiosamente, a expressão acentuada do fator inibitório I κ B α em CE humanas (HUVEC) inibiu a síntese de RNA de

A1 após estímulo com LPS ou TNF. Conseqüentemente, CE expressando $I\kappa B\alpha$ em níveis supra-fisiológicos tornaram-se sensíveis à apoptose induzida por TNF/CHX. A confirmação de que a ativação do fator de transcrição NF- κ B é necessária para expressão de *A1* foi feita pelos autores através da expressão acentuada, em BAEC, da sub-unidade ativadora RelA/p65. Esse estudo demonstrou originalmente a capacidade de um gene indutível da família Bcl-2 exercer simultaneamente as funções anti-apoptótica e anti-inflamatória, via inibição do fator NF- κ B em CE. A análise dos níveis de expressão de outros genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 em CE, realizada no mesmo estudo, revelou que os mesmos permaneceram inalterados após estímulos pró-inflamatórios semelhantes [STROKA *et al.*, 1999].

Estudos envolvendo o gene *A20* (que não pertence à família de genes Bcl-2), demonstraram que o mesmo também é, de forma similar ao gene *A1*, induzido como gene de resposta rápida associado ao processo de ativação de CE [SARMA *et al.*, 1995; FERRAN *et al.*, 1998]. O gene *A20* também tem sua expressão dependente do fator de transcrição NF- κ B, executando as mesmas funções anti-apoptótica e anti-inflamatória em CE estimuladas [COOPER *et al.*, 1996]. Observamos, portanto, que genes de famílias diferentes podem exercer funções semelhantes a partir dos mesmos estímulos inflamatórios. Quando expostas a moléculas pró-inflamatórias, as CE ativam seus genes protetores como parte do processo de ativação, visando a limitar uma ativação inflamatória exagerada (*feed-back* negativo) e evitando, dessa forma, a morte celular programada. Este processo de defesa requer a ativação do fator de transcrição NF- κ B, cuja inibição pelos genes protetores resulta, em última análise, na diminuição de expressão dos próprios. Essa alça de auto-regulação negativa limita a expressão de genes pró-inflamatórios e de genes protetores (*down-regulation*), trazendo a CE de volta ao seu fenótipo original de quiescência [BACH, HANCOCK, FERRAN, 1997].

Como já foi exposto, diversas estratégias para inibição do fator NF- κ B têm sido tentadas com pouco sucesso. O uso de anti-oxidantes é limitado por seus efeitos pouco específicos [SHIMURA *et al.*, 1999] e a inibição de ativação de NF- κ B, através da supra-expressão do fator inibitório I κ B α [ANRATHER *et al.*, 1997], resultou na sensibilização de CE à apoptose induzida por TNF.

Pelos motivos expostos, consideramos que o gene *A1* apresenta-se como ótimo candidato para hipótese de um eventual desenvolvimento da terapia genética, voltada para doenças que apresentem o processo de ativação e/ou apoptose de CE como parte significativa de seu mecanismo fisiopatológico. O gene *A1* transferido para CE seria teoricamente capaz de conferir às mesmas uma proteção adicional à já existente, representada essencialmente pelos níveis constitutivos de outras proteínas anti-apoptóticas, tais com Bcl-2 e Bcl-x_L. Isso nos levou ao estudo atual, que teve como objetivos básicos :

1) avaliar a possibilidade de transferência do gene *A1* para CE, mediada por vetores virais e não-virais; 2) analisar as funções anti-apoptótica e anti-inflamatória do gene *A1* transferido para CE por método não-viral; 3) estabelecer uma correlação entre os domínios BH4 e TM do gene *A1* e as funções protetoras supra-citadas; 4) identificar uma sequência ou domínio mínimo, capaz de reproduzir as funções anti-apoptótica e anti-inflamatória do gene *A1* em CE e, em última análise; 5) construir um vetor viral, capaz de transferir o gene *A1* de forma adequada para aproximadamente 100% de CE expostas ao vírus recombinante. A execução da etapa de número 4 permitiria a identificação de um alvo molecular para estudos de desenvolvimento de fármacos baseados em estudos de estrutura/função, enquanto o último item poderia contribuir de forma significativa para a realização de estudos de transferência genética *in vivo*.

A possibilidade de transferência do gene *A1* para CE foi confirmada utilizando-se a técnica de lipossomas catiônicos [FELGNER *et al.*, 1987]. Níveis suficientes de

proteína transgênica puderam ser detectados 48 h após a transferência genética através da técnica de *immunoblotting* (**Figura 23**). Através da utilização de plasmídeos repórteres, pudemos demonstrar que a proteína A1 transferida manteve as propriedades anti-apoptótica (por mecanismo ainda indeterminado) e anti-inflamatória, através da inibição de ativação do repórter NF- κ B/luciferase (**Figuras 25 e 24**, respectivamente). A expressão de níveis elevados de proteína A1 inibiu significativamente a apoptose induzida pelo modelo CHX/TNF (**Figura 25**). Ao mesmo tempo, a expressão de proteína A1 em CE reduziu significativamente o grau de ativação do repórter NF- κ B/luciferase (**Figura 24**).

As bases moleculares para a função anti-apoptótica de *A1* nas CE vêm sendo, progressivamente, desvendadas. Dados recentes demonstram que a proteína A1 dirige-se à membrana mitocondrial através de seu domínio anfipático transmembrana (TM). Uma vez ancorado à organela, a proteína A1 inibe a despolarização mitocondrial, a perda de citocromo *c*, a ativação da caspase 9 e das moléculas pró-apoptóticas BID e poli(ADP-ribose) polimerase. Por outro lado, acredita-se que a proteína A1 não interfira diretamente com a enzima caspase 8 nem com a caspase 3. Estudo recente demonstra que a proteção conferida pela proteína A1 contra apoptose induzida por TNF, em CE que tenham a ativação NF- κ B inibida, é de curta duração (72 h). Esses achados levaram os autores a interpretar a função anti-apoptótica de *A1* em CE como sendo limitada, suficiente apenas para a manutenção da homeostase mitocondrial por um curto período, porém incapaz de proteger a CE contra a apoptose induzida por vias alternativas (ativação não- mitocondrial de caspases) [DURIEZ *et al.*, 2000].

A primeira questão abordada em nossa análise estrutural do gene *A1* relacionou-se ao papel exercido pelo domínio TM, responsável pelo ancoramento à membrana mitocondrial, na função anti-apoptótica em CE. Um plasmídeo mutante, desprovido do domínio TM de *A1* (pAC.A1 Δ TM), foi construído e, após sequenciamento

genético automatizado confirmando a deleção desejada, transferido para BAEC *in vitro*. A expressão de proteína recombinante A1 desprovida do domínio TM (A1 Δ TM) foi capaz de inibir a apoptose induzida pelo modelo CHX/TNF em CE em nível semelhante ao conferido pelo gene A1 *wild-type* (65,4 \pm 5,3% vs. 65,5 \pm 10,5% de viabilidade celular, respectivamente; **Figura 29**). Dados similares foram descritos em estudos que correlacionaram a estrutura à função da proteína Bcl-2 em CE [BORNER *et al.*, 1994; BADRICHANI *et al.*, 1999], sugerindo que o domínio TM não seja necessário para a função anti-apoptótica dos genes anti-apoptóticos da família Bcl-2. Nossos dados colocam em dúvida os resultados obtidos por Duriez e cols. [2000], que descrevem o ancoramento das proteínas à membrana mitocondrial de A1 como essencial para sua função anti-apoptótica em CE. A discrepância observada poderia estar relacionada ao uso de diferentes CE, já que os autores citados utilizaram CE microvasculares e linhagens celulares, enquanto em nosso estudo analisamos culturas primárias de CE aórticas bovinas. Outra possível explicação para a discrepância seria a ocorrência de redistribuição da proteína mutante em nível citoplasmático e consequente homo ou hetero-dimerização com outras proteínas da família Bcl-2, com ação independente da via mitocondrial, como já foi relatado para genes pró-apoptóticos da mesma família [VELDE *et al.*, 2000]. O esclarecimento desta hipótese só deverá ocorrer através da realização de estudos dirigidos para o mapeamento da distribuição intra-celular da proteína A1 e mutantes A1 Δ TM em CE.

Após termos realizado a deleção do domínio TM, aparentemente sem prejuízo para a função anti-apoptótica da proteína A1, prosseguimos com o estudo, à procura da identificação de pelo menos 1 domínio relacionado à mesma função. Como já exposto, o gene A1 codifica 3 regiões homólogas a Bcl-2, os domínios BH1, BH2 e BH4, sendo desprovido do domínio pró-apoptótico BH3. Estudos prévios foram realizados, correlacionando os domínios de homologia de Bcl-2, funções protetoras dos genes *bcl-*

2 e *bcl-x_L* [YIN, OLTVAI, KORSMEYER, 1994; CHENG *et al.*, 1996; HUNTER, BOND, PARLOW, 1996]. Os resultados obtidos apontam para o papel dos domínios BH1 e BH2 na homo e hetero-dimerização entre proteínas da mesma família (Bcl-2), enquanto o domínio BH4 é responsável pela ligação da proteína Bcl-2 a outras moléculas (não-Bcl-2), ainda não completamente identificadas [FERNANDEZ-SARABIA & BISCHOFF, 1993; WANG, RAPP, REED, 1996; SHIBASAKI *et al.*, 1997]. O estudo de estrutura/função realizado no mesmo laboratório por Badrichani e cols. [1999] demonstrou que todos os domínios do gene *bcl-2* são necessários para a função anti-apoptótica em CE. Curiosamente, a deleção do domínio BH4 do gene *bcl-2* não somente inibiu a função anti-apoptótica do gene em CE como transformou a proteína resultante em pró-apoptótica [BADRICHANI *et al.*, 1999]. Diferentes autores relataram que a clivagem da porção N-terminal de Bcl-2 na posição **asp34** é capaz de converter a proteína anti-apoptótica Bcl-2 numa proteína semelhante ao membro pró-apoptótico Bax, da mesma família [CHENG *et al.*, 1997; HUANG, ADAMS, CORY, 1998]. Ainda não foi possível a identificação completa das enzimas envolvidas nessa modificação pós-translacional de Bcl-2, mas há evidências de que as proteases da família das caspases estejam envolvidas [CHENG *et al.*, 1997; GRANDGIRARD, 1998].

Baseado nessas informações, procedemos ao estudo de estrutura/função do gene *A1*, construindo um mutante desprovido do domínio BH4 (pAC.HA-A1ΔBH4), tendo sido utilizada a técnica de deleção dirigida por amplificação de DNA com *overlap extension* (OLE-PCR). Após a confirmação da deleção dirigida por sequenciamento genético automatizado, conforme descrito na seção **3.4.3.**, transferimos o plasmídeo codificando o gene HA-A1ΔBH4 para CE, utilizando lipossomas catiônicos, e procedemos à avaliação da função anti-apoptótica da proteína recombinante. A expressão da mesma pelas CE transfectadas foi confirmada por *immunoblotting*. Utilizando o modelo de indução de apoptose de CE por TNF, em CE pré-tratadas com

CHX, podemos demonstrar que a deleção do domínio BH4 de *A1* interfere significativamente com a função anti-apoptótica deste gene em CE. (**Figura 29**). Curiosamente, em contraste com o efeito observado após a deleção do domínio BH4 em *bcl-2* [BADRICANI *et al.*, 1999], a deleção de BH4 em *A1* inibiu a função anti-apoptótica, mas não transformou a molécula resultante em pró-apoptótica. Acreditamos que essa diferença pode ser justificada pela ausência em *A1* do domínio BH3. Esta interpretação baseia-se na análise estrutural de alguns membros da família Bcl-2, realizada por cristalografia, que demonstrou que o domínio BH3, quando presente, encontra-se internalizado e expõe-se após a clivagem do domínio BH4 [MUCHMORE *et al.*, 1996]. Supomos que a ausência do domínio BH3 em *A1* explique a falta de efeito pró-apoptótico da proteína *A1* Δ BH4 aqui observada. Os dados de nosso estudo nos permitem correlacionar, de forma original, a função anti-apoptótica do gene *A1* ao seu domínio BH4.

Uma análise semelhante foi realizada, com o objetivo de identificar o domínio responsável pela função anti-inflamatória do gene *A1* em CE, através da inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Inicialmente avaliamos os mesmos domínios estudados para a função anti-apoptótica (TM e BH4), através da utilização dos mesmos plasmídeos mutantes, pAC.*A1* Δ TM e pAC.*A1* Δ BH4, respectivamente. Para avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B, utilizamos o plasmídeo repórter NF- κ B/luciferase, conforme descrito na seção **3.5.1**. Nossos dados indicam que o domínio TM não é necessário para a função inibitória de *A1* sobre a ativação NF- κ B, enquanto o domínio BH4 é essencial para a mesma função. Os resultados obtidos mostram que a deleção do domínio BH4 priva o gene *A1* de grande parte de sua função anti-inflamatória (**Figura 27**). Analisados em conjunto, esses resultados demonstram que o domínio BH4 é responsável por ambas as funções protetoras (anti-inflamatória e anti-apoptótica) de *A1* em CE.

A função inibitória exercida pelo domínio BH4 do gene *bcl-2* sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B, já havia sido demonstrada anteriormente por Badrichani e cols. [1999]. A confirmação da função inibitória do domínio BH4 do gene *A1* sobre a ativação do mesmo fator de transcrição pode ser obtida através da clonagem de um plasmídeo codificando exclusivamente o domínio BH4 de *A1*, repetido por 4 vezes em seqüência (pAC.HA-polyBH4). Após a realização do sequenciamento automatizado e consequente confirmação da mutação desejada, transferimos o plasmídeo pAC.HA-polyBH4 para CE, pela técnica de lipossomas catiônicos, e avaliamos sua função inibitória sobre o repórter NF- κ B/luciferase. A expressão de proteína HA-polyBH4, confirmada por *immunoblotting* (**Figura 23**), conferiu às CE proteção semelhante à do gene íntegro (*wild-type*), demonstrada pela significativa diminuição da ativação dos genes repórteres, após estimulação com TNF, nos grupos A1 e polyBH4 (**Figura 28**).

As bases moleculares para a compreensão da ação inibitória do domínio BH4 do gene *A1* sobre o fator de transcrição NF- κ B ainda não estão completamente estabelecidas. Dados provenientes da literatura sugerem diferentes hipóteses, que têm em comum a busca pela identificação de uma ou mais moléculas que interajam com os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2, levando à interrupção da cascata de sinalização e consequente inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Já foi demonstrado que o *bcl-2*, gene protótipo da família que leva o mesmo nome, pode interagir com diferentes moléculas de sinalização: p21Ras, p23Ras, calcineurina e a quinase Raf-1 [FERNANDEZ-SARABIA, 1993; WANG, RAPP, REED, 1996; SHIBASAKI *et al.*, 1997]. A quinase Raf-1 é um mediador envolvido precocemente na cascata de múltiplas vias intra-celulares de sinalização (TNF, LPS, etc.), agindo entre as moléculas sinalizadoras Ras e a quinase ativada por mitógenos (MAPK) [MORRISON & CUTLER, 1997]. A possibilidade de que as vias de sinalização MAPK e NF- κ B se intercomunique ainda não foi completamente esclarecida, mas a hipótese de que a

quinase Raf-1 e algumas moléculas da família Bcl-2 possam interferir com a fosforilação e degradação de $I\kappa B\alpha$ é atraente. Para que a hipótese de interação entre o domínio BH4 de *A1* e a quinase Raf-1 possa ser confirmada serão necessários estudos de co-imuno-precipitação destas moléculas. Outra hipótese interessante surge a partir da demonstração de que a fosfatase calcineurina interage com a proteína Bcl-2 em células T, modulando a ativação do fator de transcrição NF-AT [SHIBASAKI *et al.*, 1997]. É possível que o efeito anti-inflamatório exercido pelo domínio BH4 de *A1* em CE seja mediado pela calcineurina, porém essa hipótese não pode ser analisada de forma adequada em nosso estudo. Também é possível que outras moléculas, até o momento não identificadas, possam estar intermediando a ação da proteína A1 via domínio BH4, conferindo, desta forma, a observada dupla função protetora do gene em CE. Estudos em andamento no laboratório, envolvendo a construção de um sistema de hibridização tipo *double yeast hybrid system*, poderão acrescentar dados para a identificação das moléculas de sinalização envolvidas com a proteína A1 em CE. A identificação de possíveis interações entre o domínio BH4 de *A1* e moléculas de sinalização poderá contribuir para o desenvolvimento de novas medicações para a prevenção de apoptose e/ou ativação de CE induzida por TNF.

A constatação de que níveis elevados de expressão de *A1* transferido para CE conferiram dupla proteção às mesmas, nos levou a almejar uma expressão transgênica máxima. Como já foi exposto, sabemos que os níveis de expressão proteica obtidos pelos métodos não virais de transferência genética são limitados. Por outro lado, a transferência genética mediada por adenovírus apresenta numerosas vantagens em relação às técnicas não-virais, com destaque para os níveis elevados de expressão em cerca de 100% das células. Numerosos estudos experimentais já demonstraram que a utilização de adenovírus como vetor de transferência para CE é viável e segura, levando à expressão de proteína transgênica elevada em praticamente 100% de

células expostas, com baixos níveis de toxicidade [CRYSTAL, 1995; ANDERSON, 1998; KELLEY & SUKHATME, 1999; NAKAO *et al.*, 1999, RAJAGOPALAN *et al.*, 2001, GANGADHARAN *et al.*, 2001]. Nesse sentido, construímos um adenovírus recombinante codificando para o gene A1, desprovido de seu domínio transmembrana (r.Ad.A1 Δ TM), baseado na análise de estrutura/função do gene A1 que demonstrou não ser o domínio TM necessário para suas funções protetoras.

A construção do r.Ad.A1 Δ TM foi realizada através da técnica de recombinação em linhagens celulares do tipo 293 [GRAHAM & PREVEC, 1991], conforme descrito na seção **3.7**. Após a realização, com sucesso, de todas as etapas – transfecção com lipossomas catiônicos, recombinação, purificação, titulação e propagação viral – obtivemos o adenovírus recombinante (r.Ad.A1 Δ TM) desejado. Quarenta e oito horas após a infecção de CE de porco (PAEC) com r.Ad.A1 Δ TM ou com r.Ad controle (r.Ad. β -gal), pudemos detectar a proteína A1 recombinante em aproximadamente 100% das células no primeiro grupo, conforme demonstrado por imuno-histoquímica (**Figura 31**). Níveis crescente de expressão protéica A1 foram observados, de acordo com a concentração viral utilizada, variando de zero a 500 p.f.u./célula, conforme demonstrado por *immunoblotting* (**Figura 30**).

De forma resumida, nosso estudo demonstrou que a transferência do gene *A1* para CE é viável através de técnicas viral e não-viral. A transfecção mediada por lipossomas resultou em níveis adequados de expressão gênica. O gene *A1* transferido preserva suas funções protetoras (anti-apoptótica e anti-inflamatória) em CE, evidenciada, respectivamente, pela significativa inibição de apoptose induzida por CHX/TNF e pela inibição da ativação do repórter NF- κ B pela mesma citocina. Resultados similares foram obtidos com a estimulação das CE por LPS ou IL-1 (dados não mostrados). A transferência genética não-viral permitiu ainda a realização do estudo de correlação de estrutura e função, focado nos domínios BH4 e TM do gene

A1. Nossos resultados demonstram originalmente que o domínio BH4 é necessário para a execução das funções anti-inflamatória e anti-apoptótica do gene *A1* em CE. Demonstramos ainda que o mesmo domínio (BH4) é suficiente para a função anti-inflamatória do gene *A1* em CE, via inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Por outro lado, o domínio TM não é necessário para as funções protetoras da proteína *A1* em CE.

Com base nos resultados obtidos, acreditamos que a transferência genética do gene *A1* para CE deva ser considerada como uma nova possibilidade terapêutica para patologias que apresentem os fenômenos de ativação de CE e apoptose, tais como a rejeição crônica e aguda de alo ou xenotransplantes, a sepse, a síndrome de resposta inflamatória sistêmica, a síndrome hemolítico-urêmico e as vasculites em geral. A partir dos dados obtidos, novos estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* estão sendo iniciados no laboratório, utilizando o adenovírus transgênico codificador do gene (Ad.A1 Δ TM), construído por nós.

A identificação do papel exercido pelo domínio BH4 na proteção de CE será também objeto de novos estudos, farmacológicos e de terapia gênica, que poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento destas e de outras patologias que se caracterizem pelos fenômenos de ativação de CE e apoptose, objetivo máximo de nossos esforços.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A transferência do gene *A1* para células endoteliais (CE) é possível, através da utilização de técnicas viral e não-viral;
 2. O gene *A1* transferido para CE preserva suas funções protetoras, anti-apoptótica e anti-inflamatória;
 3. O domínio BH4 é essencial para as funções anti-inflamatória e anti-apoptótica do gene *A1* em CE; neste tipo celular, o domínio BH4 mostrou-se suficiente para reproduzir a função anti-inflamatória do gene *A1* íntegro, através da inibição da ativação do fator NF- κ B;
 4. O domínio transmembrana (TM) do gene *A1* não é necessário, em CE, para suas funções anti-apoptótica ou anti-inflamatória;
 5. A construção de um vetor viral (r.Ad.A1 Δ TM), capaz de transferir o gene *A1* de forma adequada para aproximadamente 100% de CE expostas, abre novas perspectivas para sua aplicação futura em estudos de transferência genética, *in vivo* ou *in vitro*, dirigidos para o tratamento de doenças que caracterizam-se pela ativação e/ou apoptose de CE.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. M. & CORY, S. – The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, **281**: 1322-1326, 1998.

ANDERSON, W. F. – Human gene therapy. **Nature**, **392**:25-30, 1998.

ANRATHER, J.; CSIZMADIA, V.; BROSTJAN, C.; SOARES, M. P.; BACH, F. H.; WINKLER, H.
– Inhibition of bovine endothelial cell activation in vitro by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF- κ B. **J. Clin. Invest.**, **99**:763-772, 1997.

AOKI, M.; NATA, T.; MORISHITA, R.; MATSUSHITA, H.; NAKAGAMI, H.; YAMAMOTO, K.;
YAMAZAKI, K.; NAKABAYASHI, M.; OGIHARA, T.; KANEDA, Y. - Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. **Hypertension**, **38**:48-55, 2001.

ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. – Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **190**:149-153, 1993.

ARAKI, S.; SHIMADA, Y.; KAJI, K.; HAYASHI, H. – Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **168**:1194-1200, 1990.

- BACH, F. H.; HANCOCK, W. W.; FERRAN, C. – Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. **Immunol. Today**, **18**:483-486, 1997.
- BADRICHANI, A. Z.; STROKA, D. M.; BILBAO, G.; CURIEL, D. T.; BACH, F. H.; FERRAN, C. – Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF- κ B. **J. Clin. Invest.**, **103**:543-553, 1999.
- BAKSHI, A.; JENSEN, J. P.; GOLDMAN, P.; WRIGHT, J. J.; McBRIDE, O. W.; EPSTEIN, A. L.; KORSMEYER, J. – Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. **Cell**, **41**:899-906, 1985.
- BALLA, J.; BALLA, G.; JENEY, V.; KAKUK, G.; JACOB, H. S.; VERCELLOTTI, G. M. - Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. **Blood**, **95**:3442-3450, 2000.
- BEG, A. A. & BALDWIN Jr., A. S. – The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/ NF- κ B transcription factors. **Genes Dev.**, **7**:2064-2070, 1993.
- BIANCHI, E.; BENDER, J. R.; BLASI, F.; PARDI, R. – Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration. **Immunol. Today**, **18**:586-591, 1997.
-

- BLAKELY, M. L.; van der WERF, W. J.; BERNDT, M. C.; DALMASSO, A. P.; BACH, F. H.; HANCOCK, W. W. - Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. **Transplantation**, **58**:1059-1066, 1994.
- BOISE, L. H.; GONZALEZ, G. M.; POSTEMA, C. E.; DING, L.; LINDSTEN, T.; TURKA, L. A.; MAO, X.; NUNEZ, G.; THOMPSON, C. B. – Bcl-xL, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. **Cell**, **74**:597-608, 1993.
- BOMBELI, T.; MUELLER, M.; HAEBERLI, A. – Anticoagulant properties of the vascular endothelium. **Thrombosis & Haemostasis**, **77**:408-423, 1997.
- BORNER, C.; MARTINOU, I.; MATTMANN, C.; IRMLER, M.; SCHAEERER, E.; MARTINOU, J. C.; TSCHOPP, J. – The Bcl-2 does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. **J. Cell Biol.**, **126**:1059-1068, 1994.
- BRADFORD, M. M. – A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, **72**:248-254, 1976.
- BRADLEY, J. R.; WILKS, D.; RUBENSTEIN, D. – The vascular endothelium in septic shock. **J. Infection**, **28**:1-10, 1994.
- BRASIER, A. R.; TATE, J. E.; HABENER, J. F. – Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cells. **Biotechniques**, **7**:1116-1122, 1989.
-

CARRIO, R.; LOPEZ-HOYOS, M.; JIMENO, J.; BENEDICT, M.A.; MERINO, R.; BENITO, A.; FERNANDEZ-LUNA, J.L.; NUNEZ, G.; GARCIA-PORRERO, J.A.; MERINO, J. - A1 demonstrates restricted tissue distribution during embryonic development and functions to protect against cell death. **Am. J. Pathol.**, **149**:2133-2142, 1996.

CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. – Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**:7413-7417, 1987.

CHAO, D. T.; LINETTE, G. P.; BOISE, L. H.; WHITE, L. S.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. – Bcl-xL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. **J. Exp. Med.**, **182**:821-828, 1995.

CHENG, E. H. Y.; LEVINE, B.; BOISE, L. H.; THOMPSON, C. B.; HARDWICK, J. M. – Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-x_L. **Nature**, **379**:554-556, 1996.

CHENG, E. H.; KIRSCH, D. G.; CLEM, R. J.; RAVI, R.; KASTAN, M. B.; BEDI, A.; UENO, K.; HARDWICK, J. M. – Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. **Science**, **278**:1966-1968, 1997.

CHINNAIYAN, A. M.; CHAUDHARY, D.; O'ROURKE, K.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. – Role of CED-4 in the activation of CED-3. **Nature**, **388**:728-729, 1997.

- CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; DIXIT, V. M. – FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, **81**:505-512, 1995.
- CHINNAIYAN, A.M.; O'ROURKE, K.; LANE, B. R.; DIXIT, V. M. – Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. **Science**, **275**:1122-1126, 1997.
- CHITTENDEN, T.; FLEMINGTON, C.; HOUGHTON, A. B.; EBB, R. G.; GALLO, G. J.; ELANGOVAN, B.; CHINNADURAI, G.; LUTZ, R. J. – A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **EMBO J.**, **14**:5589-5596, 1995.
- CHOI, S.S.; PARK, I.C.; YUN, J.W.; SUNG, Y.C.; HONG, S.I.; SHIN, H.S. - A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. **Oncogene**, **11**:1693-1698, 1995.
- CHUANG, P.I.; YEE, E.; KARSAN, A.; WINN, R.K.; HARLAN, J.M. - A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **249**:361-365, 1998.
- CLEARY, M. L.; SMITH, S. D.; SKLAR, J. – Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. **Cell**, **47**:19-28, 1986.
-

- COLLINS, T.; READ, M. A.; NEISH, A. S.; WHITLEY, M. Z.; THANOS, D.; MANIATIS, T. -
Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and
cytokine-inducible enhancers. **FASEB J.**, **9**:899-909, 1995.
- CONWAY, E. M.; ROSENBERG, R. D. – Tumor necrosis factor suppresses transcription of
the thrombomodulin gene in endothelial cells. **Mol. Cell. Biol.**, **8**:5588-5592, 1988.
- COOPER, J. T.; STROKA, D. M.; BROSTJAN, C.; PALMETSHOFER, A.; BACH, F. H.;
FERRAN, C. – A20 blocks endothelial cell activation through a NF-κB-dependent
mechanism. **J. Biol. Chem.**, **271**:18068-18073, 1996.
- COTRAN, R. S. & POBER, J.S. – Cytokine-endothelial interactions in inflammation,
immunity, and vascular injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **1**:225-235, 1990.
- COTRAN, R. S. & POBER, J.S. – Effects of cytokines on vascular endothelium: their role in
vascular and immune injury. **Kidney Int.**, **35**:969-975, 1989.
- CRAXTON, A.; CHUANG, P. I.; SHU, G.; HARLAN, J. M.; CLAR, E. A. - The CD40-inducible
Bcl-2 family member A1 protects B cells from antigen receptor-mediated apoptosis.
Cell Immunol., **200**:56-62, 2000.
- CRYSTAL, R. G. – Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.
Science, **270**:404-410, 1995.
-

DALMASSO, A. P.; BENSON, B. A.; SCHROEDER, A. A.; ABRAHAMSEN, M. S. - Biochemical basis for induction of resistance to human complement in porcine endothelial cells by α GAL ligation. **Transplant. Proc.**, **32**:974, 2000.

DIXIT, V. M.; GREEN, S.; SARMA, V.; MARKS, R. M. – TNF- α induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. **J. Biol. Chem.**, **265**:2973-2978, 1990.

D'SA-EIPPER, C.; SUBRAMANIAN, T.; CHINNADURAI, G. - Bfl-1, a Bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity. **Cancer Res.**, **56**:3879-3882, 1996.

DURIEZ, P. J.; WONG, F.; DOROVINI-ZIS, K.; SHAHIDI, R.; KARSAN, A. – A1 functions at the mitochondria to delay endothelial cell apoptosis in response to tumor necrosis factor. **J. Biol. Chem.**, **275**:18099-18107, 2000.

EMEIS, J.J.; van den EIJDEN-SCHRAUWEN, Y.; van den HOOGEN, C. M.; de PRIESTER, W.; WESTMUCKETT, A.; LUPU, F. - An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. **J. Cell Biol.**, **139**:245-256, 1997.

ESMON, T.M. - The regulation of natural anticoagulant pathways. **Science**, **235**:1348-1352, 1987.

EVAN, G. & LITTLEWOOD, T. – A matter of life and cell death. **Science**, **281**:1317-1322, 1998.

FELGNER, P. L.; GADEK, T. R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. – Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:7413-7417, 1987.

FERNANDEZ-SARABIA, M. & BISCHOFF, J. R. – Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. **Nature**, **366**:274-275, 1993.

FERRAN, C.; MILLAN, M. T.; CSIZMADIA, V.; COOPER, J. T.; BROSTJAN, C.; BACH, F. H. – Inhibition of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **214**:212-223, 1995.

FERRAN, C.; PEUCHMAUR, M.; DESRUENNES, M.; GHOUSSOUB, J. J.; CABROL, A.; BROUSSE, N.; CABROL, C.; BACH, J. F.; CHATENAUD, L. - Implications of de novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection. **Transplantation**, **55**:605-609, 1993.

FERRAN, C.; STROKA, D. M.; BADRICHANI, A. Z.; COOPER, J. T.; WRIGHTON, C. J.; SOARES, M.; GREY, S. T.; BACH, F. H. - A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. **Blood.**, **91**:2249-2258, 1998.

GANGADHARAN, S. P.; IMAI, M.; RHYNHART, K. K.; SEVIGNY, J.; ROBSON, S. C.; CONTE, M. S. – Targeting platelet aggregation: cd39 gene transfer augments nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in injured rabbit arteries. **Surgery**, **130**:256-303, 2001.

GERARD, R. D. & MEIDELL, R. S. – Adenovirus-mediated gene transfer. **T. C. M.**, **3**:171-177, 1993.

GERBER, H. P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. - Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, **273**:13313-13316, 1998.

GERRITSEN, M. E. & BLOOR, C. M. - Endothelial cell gene expression in response to injury. **FASEB J.**, **7**:523-532, 1993.

GIMBRONE, M. A. J. – Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, **75**:67B-70B, 1995.

GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RUDDLE, F. H. – Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **77**:7380-7384, 1980.

GRAHAM, F. L. & PREVEC, L. – Manipulation of adenovirus vectors. In: MURRAY, E. J., Ed.

– **Methods in molecular biology**, Vol. 7: Gene transfer and expression protocols.

The Humana Press Inc., Clifton, NJ, E. U. A., 1991.

GRANDGIRARD, D.; STUDER, E.; MONNEY, L.; BELSER, T.; FELLAY, I.; BORNER, C.;

MICHEL, M. R. – Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. **EMBO J.**, **17**:1268-1278, 1998.

GREEN, D. R. & REED, J. C. - Mitochondria & apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312, 1998.

GRUMONT, R. J.; ROURKE, I. J.; GERONDAKIS, S. - Rel-dependent induction of A1

transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. **Genes Dev.**, **13**:400-411, 1999.

HAIMOVITZ, F. A.; CORDON, C. C.; BAYOUMY, S.; GARZOTTO, M.; McLOUGHLIN, M.;

GALLILY, R.; EDWARDS, C.; SCHUCHMAN, E. H.; FUKS, Z.; KOLESNICK, R. –

Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. **J. Exp. Med.**, **186**:1831-1841, 1997.

HAJRA, L.; EVANS, A. I.; CHEN, M.; HYDUK, S. J.; COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. – The

NF- κ B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.**

A., **97**:9052-9057, 2000.

HAMASAKI, A.; SENDO, F.; NAKAYAMA, K.; ISHIDA, N.; NEGISHI, I.; NAKAYAMA, K-i.; HATAKEYAMA, S. - Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. **J. Exp. Med.**, **188**:1985-1992, 1998.

HATAKEYAMA, S.; HAMASAKI, A.; NEGISHI, I.; LOH, D. Y.; SENDO, F.; NAKAYAMA, K-i. - Multiple gene duplication and expression of mouse *bcl-2* related genes, A1. **Int. Immunol.**, **10**:631-637, 1998.

HENGARTNER, M. - Apoptosis. CED-4 is a stranger no more. **Nature**, **388**:714-715, 1997.

HENGARTNER, M. - Death by crowd control. **Science**, **281**:1298-1299, 1998.

HOCKENBERY, D. M.; OLTVAI, Z. N.; YIN, X. M.; MILLIIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. - Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, **75**:241-251, 1993.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDDEL, D. V. - The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. **Cell**, **81**:495-504, 1995.

HU, X.; YEE, E.; HARLAN, J. M.; WONG, F.; KARSAN, A. - Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. **Blood**, **92**:2759-2765, 1998.

HU, Y.; BENEDICT, M. A.; WU, D.; INOHARA, N.; NUNEZ, G. – Bcl-X_L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1 dependent caspase-9 activation. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **95**:4386-4391, 1998.

HUANG, D. C.; ADAMS, J. M.; CORY, S. – The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. **EMBO J.**, **17**: 1029-1039, 1998.

HUNOT, S. & FLAVELL, R. A. – Apoptosis: death of a monopoly? **Science**, **292**:865-866, 2001.

HUNTER, J. J.; BOND, B. L.; PARSLOW, T. G. - Functional dissection of the human Bcl-2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, **16**:877-883, 1996.

JAATTELA, M.; MOURITZEN, H.; ELLING, F.; BASTHOLM, L. – A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. **J. Immunol.**, **156**:1166-1173, 1996.

JAFFE, E. A. - Biochemistry, immunology and cell biology of the endothelium. In: COLMAN, R. W.; MARDER, V. J., SALZMAN, E. W., ed. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. 3rd. ed., Philadelphia, Lippincott Company, 1994. pp. 718-736.

JAIN, V. K. & MAGRATH, I. T. – A chemiluminescent assay for the quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells. **Anal. Biochem.**, **199**:119-124, 1991.

JOZA, N.; SUSIN, S. A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W. L.; CHO, S. K.; LI, C. Y.; SASAKI, T.; ELIA, A. J.; CHENG, H. Y.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K. F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y. Y.; MAK, T. W.; ZUNIGA-PFLUCKER, J. C.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. – Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, **410**:549-554, 2001.

KARSAN, A.; YEE, E.; HARLAN, J. M. – Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- α is inhibited by the Bcl-2 family member A1. **J. Biol. Chem.**, **271**:27201-27204, 1996.

KARSAN, A.; YEE, E.; POIRIER, G. G.; ZHOU, P.; CRAIG, R.; HARLAN, J. M. - Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2-dependent and independent mechanisms. **Am. J. Pathol.**, **151**:1775-1784, 1997.

KELEKAR, A. & THOMPSON, C. B. – Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. **Trends in Cell Biol.**, **8**:324-330, 1998.

KELLEY, V. R. & SUKHATME, V. P. – Gene transfer in the kidney. **Am. J. Physiol.** **276**:F1-F9, 1999.

- KERR, J. F.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. – Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol.**, **46**:1-27, 1995.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. – Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, **26**:239-257, 1972.
- KIEFER, M. C.; BRAUER, M. J.; POWERS, V. C.; WU, J. J.; UMANSKY, S.; TOMEI, L. D.; BARR, P. J. – Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. **Nature**, **374**:736-739, 1995.
- KRAJEWSKI, S.; TANAKA, S.; TAKAYAMA, S.; SCHIBLER, M. J.; FENTON, W.; REED, J. C. – Investigation of the subcellular distribution of the *bcl-2* oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. **Cancer Res.**, **53**:4701-4714, 1993.
- KROEMER, G. – The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat. Med.**, **3**: 614-629, 1997.
- KROEMER, G. & REED, J.C. - Mitochondrial control of cell death. **Nature Med.** **6**:513-9, 2000.
- KROEMER, G.; PETIT, P.; ZAMZANI, N.; VAYSSIÈRE, L.; MIGNOTTE, B. – The biochemistry of programmed cell death. **FASEB J.**, **9**:1277-1287, 1995.
-

LAINE, J.; ETELAMAKI, P.; HOLMBERG, C.; DUNKEL, L. – Apoptotic cell death in human chronic allograft rejection. **Transplantation**, **63**:101-105, 1997.

LeBRUN, D. P.; WARNKE, R. A.; CLEARY, M. L. – Expression of *bcl-2* in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. **Am. J. Pathol.** **142**:743-753, 1993.

LEE, H.H.; DADGOSTAR, H.; CHENG, Q.; SHU, J.; CHENG, G. - NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **96**:9136-9141, 1999.

LEVIN, E. G. & del ZOPPO, G. J. – Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. **Am. J. Pathol.**, **144**:855-861, 1994.

LIN, E.Y.; KOZAK, C.A.; ORLOFSKY, A.; PRYSTOWSKY, M.B. - The *bcl-2* family member, *Bcl2a1*, maps to mouse chromosome 9 and human chromosome 15. **Mamm. Genome**, **8**:293-294, 1997.

LIN, E.Y.; ORLOFSKY, A.; BERGER, M.S.; PRYSTOWSKY, M.B. - Characterization of A1, a novel hematopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to *bcl-2*. **J. Immunol.**, **151**:1979-88, 1993.

LIOU, H. C. & BALTIMORE, D. – Regulation of the NF- κ B/rel transcription factor and I κ B inhibitor system. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **5**:477-487, 1993.

- LIU, S. F.; YE, X.; MALIK, A. B. - Inhibition of NF-kappa B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *in vivo* expression of proinflammatory genes. **Circulation**, **100**:1330-1337, 1999.
- LU, Q. L.; POULSOM, R.; WONG, L.; HANBY, A. M. – Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. **J. Pathol.**, **169**:431-437, 1993.
- MA, A.; PENA, J. C.; CHANG, B.; MARGOSIAN, E.; DAVIDSON, L.; ALT, F. W.; THOMPSON, C. B. – Bcl-xL regulates the survival of double-positive thymocytes. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **92**:4763-4767, 1995.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; VECCHI, A.; INTRONA, M.; ALLAVENA, P. – Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. **Thrombosis & Haemostasis**, **78**:406-4114, 1997.
- McGRORY, W. J.; BAUTISTA, D. S.; GRAHAM, F. L. – A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. **Virology**, **163**:614-617, 1988.
- MILLAN, M. T.; GECZY, C.; STUHLMEIER, K. M.; GOODMAN, D. J.; FERRAN, C.; BACH, F. H. - Human monocytes activate porcine endothelial cells, resulting in increased E-selectin, interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1, and plasminogen activator inhibitor-type-1 expression. **Transplantation**, **63**:421-429, 1997.
-

MORRISON, D. K. & CUTLER, R. E. – The complexity of Raf-1 regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **9**:174-179, 1997.

MUCHMORE, S. W.; SATTLER, M.; LIANG, H.; MEADOWS, R. P.; HARLAN, J. E.; YOON, H. S.; NETTESHEIM, D.; CHANG, B. S.; THOMPSON, C. B.; WONG, S. L.; FESIK, S. W. – X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, an inhibitor of programmed cell death. **Nature**, **381**: 335-341, 1996.

N'GUYEN, M.; BRANTON, P. E.; WALTON, P. A.; OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J.; SHORE, G. C. – Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. **J. Biol. Chem.**, **269**:16521-16524, 1994.

NAKAO, A.; FUJII, M.; MATSUMURA, R.; KUMANO, K.; SAITO, Y.; MIYAZONO, K.; IWAMOTO, I. – Transient gene transfer and expression of *Smad7* prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. **J. Clin. Invest.**, **104**:5-11, 1999.

NIWA, M.; HARA, A.; KANAMORI, Y.; HATAKEYAMA, D.; SAIO, M.; TAKAMI, T.; MATSUNO, H.; KOZAWA, O.; UEMATSU, T. - Nuclear factor-kappa B activates dual inhibition sites in the regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, **407**:211-219, 2000.

NOBLE, K. E.; WICKREMASINGHE, R. G.; DECORNET, C.; PANAYIOTIDIS, P.; YONG, K. L. - Monocytes stimulate expression of the Bcl-2 family member, A1, in endothelial cells and confer protection against apoptosis. **J. Immunol.**, **162**:1376-1383, 1999.

NOR, J.E.; CHRISTENSEN, J.; LIU, J.; PETERS, M.; MOONEY, D. J.; STRIETER, R. M.; POLVERINI, P. J. - Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. **Cancer Res.**, **61**:2183-2188, 2001.

OBERLE, S.; SCHWARTZ, P.; ABATE, A.; SCHRODER, H. - The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **261**:28-34, 1999.

OPIPARI Jr., A. W.; BOGUSKI, M. S., DIXIT, V. M. - The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. **J. Biol. Chem.**, **265**:14705-14708, 1990.

OPIPARI, A. J.; BOGUSKI, M. S.; DIXIT, V. M. - The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. **J. Biol. Chem.**, **265**:14705-14708, 1990.

OPIPARI, A. J.; HU, H.M.; YABKOWITZ, R.; DIXIT, V. M. - The A20 zinc finger protein protects cells from TNF cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, **267**:12424-12427, 1992.

OSTERUD, B. Tissue factor: a complex biological role. **Thrombosis & Haemostasis**, **78**:755-758, 1997.

PALOMBELLA, V. J.; RANDO, O.J.; GOLDBERG, A. L.; MANIATIS, T. – The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. **Cell**, **78**:773-785, 1994.

PARK, I. W.; ULLRICH, C. K.; SCHOENBERGER, E.; GANJU, R. K.; GROOPMAN, J. E. – HIV-1 tat induces microvascular endothelial apoptosis through caspase activation. **J. Immunol.**, **167**:2766-2771, 2001.

POBER, J. S. & COTRAN, R. S. - The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, **50**:537-544, 1990.

POBER, J. S.; DOUKAS, J.; HUGHES, C.C.; SAVAGE, C. O.; MUNRO, J. M.; COTRAN, R. S. – The potential roles of vascular endothelium in immune reactions. **Hum. Immunol.**, **28**:258-262, 1990.

POLUNOVSKY, V. A.; WENDT, C. H.; INGBAR, D. H.; PETERSON, M. S.; BITTERMAN, P. B. – Induction of endothelial cell apoptosis by TNF α : modulation by inhibitors of protein synthesis. **Exp. Cell Res.**, **214**:584-594, 1994.

RAJAGOPALAN, S.; SHAH, M.; LUCIANO, A.; CRYSTAL, R.; NABEL, E. G. – Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF (121) improves lower-extremet endothelial function and flow reserve. **Circulation**, **104**:753-755, 2001.

- READ, M. A.; WHITLEY, M. Z.; WILLIAMS, A. J.; COLLINS, T. - NF- κ B and I κ B – an inducible regulatory system in endothelial activation. **J. Exp. Med.**, **179**:503-512, 1994.
- REED, J. C. – Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. **J. Cell. Biol.**, **124**:1-6, 1994.
- REED, J. C. – Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **Nature**, **387**:773-776, 1997.
- REED, J. C. – Mechanisms of apoptosis. **Am. J. Pathol.**, **157**:1415-1430, 2000.
- ROBAYE, B.; MOSSELMANS, R.; FIERS, W.; DUMONT, J. E.; GALAND, P. – Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. **Am. J. Pathol.**, **138**:447-453, 1991.
- ROBSON, S. C.; COOPER, D. K. C.; d'ÁPICE, A. J. F. – Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. **Xenotransplantation**, **7**:166-176, 2000.
- ROBSON, S.C.; KACZMARECK, E.; SIEGEL, J.B.; CANDINAS, D.; KOZIAK, K.; MILLAN, M.T.; HANCOCK, W.W; BACH, F.H. – Loss of ATP diphosphohydrolase (ATPDase) activity with endothelial cell activation. **J. Exp. Med.**, **185**:153-163, 1997.
-

ROSE, J. K.; BUONOCORE, L.; WHITT, M. A. – A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. **Biotechniques**, **10**:520-525, 1991.

ROSENBERG, R. D. & ROSENBERG, J. S. – Natural anticoagulant mechanisms. **J. Clin. Invest.**, **74**:1-6, 1984.

ROTHER, M.; SARMA, V.; DIXIT, V. M.; GOEDDEL, D. V. – TRAF-2-mediated activation of NF- κ B by the TNF receptor 2 and CD40. **Science**, **269**:1424-1427, 1995.

ROTHER, M.; WONG, S. C.; HENZEL, W. J.; GOEDDEL, D. V. – A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, **78**:681-692, 1994.

SARMA, V.; LIN, Z.; CLARK, L.; RUST, B. M.; TEWARI, M.; NOELLE, R. J.; DIXIT, V. M. – Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. **J. Biol. Chem.**, **270**:12343-12346, 1995.

SATO, K.; BALLA, J.; OTTERBEIN, L.; SMITH, R. N.; BROUARD, S.; LIN, Y.; CSIZMADIA, E.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C.; VERCELLOTTI, G.; CHOI, A. M.; BACH, F. H.; SOARES, M. P. - Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. **J. Immunol.**, **166**:4185-4194, 2001.

SATTLER, M.; LIANG, H.; NETTESHEIM, D.; MEADOWS, R. P.; HARLAN, J. E.; EBERSTADT, M.; YOON, H. S.; SHUKER, S. B.; CHANG, B. S.; MINN, A. J.;

- THOMPSON, C. B.; FESIK, S. W. – Structure of Bcl-x_L-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. **Science**, **275**:983-986, 1997.
- SÉVIGNY, J., LEVESQUE, F. P., GRONDIN, G., BEAUDOIN, A. R. - Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by immunological techniques. **Biochim. Biophys. Acta**, **1334**:73-88, 1997.
- SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAIZEL Jr., J. V. – Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **28**:815-20, 1967.
- SHIBASAKI, F.; KONDO, E.; AKAGI, T.; McKEON, F. – Suppression of signaling through transcription factor NF-AT interactions between calcineurin and Bcl-2. **Nature**, **386**:728-731, 1997.
- SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KOSAKA, H.; KAMIIE, W.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. – Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-x_L. **Nature**, **374**:811-813, 1995.
- SHIMURA, H.; YAMAGUCHI, M.; KUZUME, M.; MATSUMIYA, A.; MATSUMOTO, T.; SAKAI, H.; HATAKEYAMA, T.; NAKANO, H.; KUMADA, K.; MIDORIKAWA, T.; YOSHIZAWA, Y.; SANADA, Y.; OHATA, H.; SAKAGAMI, H.; TAKEDA, M. - Prevention of reactive oxygen-induced endothelial cell injury by blocking its process. **Eur. Surg. Res.** **31**:390-398, 1999.
-

STROKA, D. M.; BADRICHANI, A. Z.; BACH, F. H.; FERRAN, C. - Overexpression of A1, an NF- κ B –inducible anti-apoptotic Bcl gene, inhibits endothelial cell activation. **Blood**, **93**:3803-3810, 1999.

SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; DAUGAS, E.; WANG, H. G.; GELAY, S.; FASSY, F.; REED, C.; KROEMER, G. – The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95 and ceramide-induced apoptosis. **J. Exp. Med.**, **186**:25-37, 1997.

THANOS, D.; MANIATIS, T. - NF- κ B: a lesson in family values. **Cell**, **80**:529-532, 1995.

THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. – Caspases: enemies within. **Science**, **281**:1312-1316, 1998.

TOLLEFSEN, D. M.; PESTKA, C. A.; MONAFO, W. J. - Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. **J. Biol. Chem.**, **258**:6713-6716, 1983.

TOMAYKO, M. M. & CANCRO, M. P. - Long-lived B cells are distinguished by elevated expression of A1. **J. Immunol.**, **160**:107-111, 1998.

TOMAYKO, M. M.; PUNT, J. A.; BOLCAVAGE, J. M.; LEVY, S. L.; ALLMAN, D. M.; CANCRO, M. P. - Expression of the Bcl-2 family member A1 is developmentally regulated in T cells. **Int. Immunol.**, **11**:1753-1761, 1999.

TONEGUZZO, F.; HAYDAY, A.; KEATING, A. – Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. **Mol. Cell. Biol.**, **6**: 703-706, 1986.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. – Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**:4350-4354, 1979.

U.S. Department of Health and Human Services. - **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. 3rd ed. U.S. Department of Health and Human Services publication no. CDC93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1993.

VAUX, D. L. & KORSMEYER, S. J. - Cell death in development. **Cell**, **96**:245-254, 1999.

VAUX, D. L.; WEISSMAN, I. L.; KIM, S. K. – Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. **Science**, **258**:1955-1957, 1992.

VELDE, C. V.; CIZEAU, J.; PARK, J. H.; REED, J. H.; GIETZ, R. D.; GREENBERG, A. H. – BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-xL and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. **J. Biol. Chem.** **275**:1439-1448, 2000.

WANG, D. & BALDWIN Jr., A. S. - Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. **J. Biol. Chem.**, **273**:29411-29416, 1998.

WANG, H. G.; RAPP, U. R.; REED, J. C. – Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. **Cell**, **87**:629-638, 1996.

WANG, J. H.; REDMOND, H. P.; WATSON, R. W. G.; DUGGAN, S.; MCCARTHY, J.; BARRY, M.; BOUCHIER-HAYES, D. – Mechanisms involved in the induction of human endothelial cell necrosis. **Cell Immunol.**, **168**:91-99, 1996.

WANG, K.; YIN, X. M.; CHAO, D. T.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. – BID: a novel BH3 domain-only death agonist. **Genes Dev.**, **10**:2859-2869, 1996.

WARD, P. A. - Mechanisms of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils. **Am. J. Med.**, **91**:89S, 1991.

WEI, M. C.; ZONG, W. X.; CHENG, E. H. Y.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MacGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. – Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, **292**:727-730, 2001.

- WILLIAMS, R. S.; JOHNSON, S. A.; RIEDY, M.; DEVIT, M. J.; McELLIGOTT, S. G.;
SANFORD, J. C. – Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-
coated microprojectiles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**:2726-2730, 1991.
- WILLIS, D.; MOORE, A.; FREDERICK, R.; WILLOUGHBY, D. – Heme oxygenase: A novel
target for immunomodulation of the inflammatory response. **Nature Med.**, **2**:87-90,
1996.
- WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.;
FELGNER, P. L. – Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. **Science**, **247**:1465-
1468, 1990.
- WRIGHTON, C. J., WARBINEK, R. H.; MOLL, T.; EYTNER, R.; BACH, F. H.; de MARTIN, R.
– Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I- κ B α ,
an inhibitor of the transcription factor NF- κ B. **J. Exp. Med.**, **183**:1013-1022, 1996.
- XIAO, W.; CHIRMULE, N.; BERTA, S. C.; McCULLOUGH, B.; GAO, G.; WILSON, J. M. –
Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. **J. Virol.**, **73**:3994-
4002, 1999.
- YANG, E.; ZHA, J.; JOCKEL, J.; BOISE, L. H.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. – Bad,
a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death.
Cell, **80**: 285-291, 1995.
-

- YIN, X. M.; OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J. – BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature**, **369**:321-323, 1994.
- ZAMZAMI, N.; BRENNER, C.; MARZO, I.; SUSIN, S. A.; KROEMER, G. – Subcellular and submitochondrial mode of actino of Bcl-2-like oncoproteins. **Oncogene**, **16**:2265-2282, 1998.
- ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; McINTYRE, T. M. – Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, **13**:93-100, 1992.
- ZONG, W. X.; EDELSTEIN, L. C.; CHEN, C.; BASH, J.; GELINAS, C. - The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. **Genes Dev.**, **13**:382-387, 1999.
-