



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“Desarrollo de baculovirus como vectores de expresión para el estudio
de la activación de células endoteliales humanas primarias”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MARCO ANTONIO ALFONZO MÉNDEZ

TUTOR:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



México, D.F.

Agosto de 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE

Estimado Dr. Graue:

Por este medio, me permito informar a usted que el Subcomité Académico de la Licenciatura ha designado Jurado para el examen profesional del alumno **MARCO ANTONIO ALFONZO MÉNDEZ**, con número de cuenta **303807450**, quien presenta la tesis: "Desarrollo de Baculovirus como vectores de expresión para el estudio de la activación de células endoteliales humanas primarias", dirigida por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

El jurado está integrado por:

Presidente: Dr. Edgar Zenteno Galindo
Secretario: Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Vocal: Dr. Luis Padilla Noriega
Suplente: Dra. Rocio Alcántara Hernández
Suplente: Dra. Patricia Tato Zaldivar

Agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., junio 10 de 2010
EL COORDINADOR



Licenciatura en Investigación
Biomédica Básica
Coordinación
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Agradecimientos

A mis padres, por su cariño, comprensión y apoyo para terminar este ciclo en mi vida académica.

A mi hermano Héctor por acompañarme estos 12 años y por las risas.

A mis abuelitos que me han consentido desde pequeño.

A José Luis por ser fundamental en el desarrollo de esta tesis y compartirme sus conocimientos.

Al Dr. Zentella por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por sus consejos, su ejemplo y enseñanzas.

A los alumnos y personal de la Unidad de Bioquímica por los momentos compartidos.

A la Sra. Manuela Gallaga por sus atenciones durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos: Alfredo, Idalia, Paloma y Rodolfo.

A Cynthia Lima, por su ayuda en los trámites escolares.

A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Antecedentes	
1. Baculovirus	3
1.1 Generalidades	
1.2 La familia <i>baculoviridae</i> : estructura y clasificación	4
1.3 Aplicaciones tradicionales de baculovirus	9
2. Transferencia de material genético mediado por baculovirus en células de mamífero	11
3. El endotelio vascular y la reacción inflamatoria	18
3.1 Estructura y fisiología del endotelio	18
3.2 La reacción inflamatoria y los cambios en el fenotipo endotelial	19
4. La vía de señalización de NF- κ B	25
Justificación	29
Hipótesis	31
Obejtivo	32
Material y Métodos	33
• Obtención y cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano	
• Cultivo de líneas celulares de mamífero	
• Cultivo de células de insecto	
• Construcción y análisis de plásmidos	
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
• Transfección de HEK 293T	
• Producción de los baculovirus recombinantes	
• Transducción de células endoteliales	
• Citometría de flujo	
• Ensayo de adhesión	
• Inmuno ensayos tipo western blot	

Resultados	41
<ul style="list-style-type: none">• Susceptibilidad de transducción mediada por baculovirus en células endoteliales• Evaluación de la respuesta de las células endoteliales a baculovirus modificados mediante un ensayo funcional de adhesión• Análisis de la expresión de moléculas de adhesión selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1, en células endoteliales humanas tratadas con TNFα• Construcción de un vector recombinante baculoviral para la expresión transitoria de IκBα S32/36A en células de mamífero• Análisis de la expresión de IκBα en células HEK 293T transfectadas con vectores derivados de baculovirus	
Discusión	53
Conclusiones	59
Perspectivas	60
Referencias	61

ABREVIATURAS

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> múltiple núcleopolihedrovirus
BV	Virión libre
CE	Células endoteliales
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CMV	Citomegalovirus
GFP	Proteína verde fluorescente
HDAC	Desacetilasas de histonas
hpt	horas posteriores a la transducción
HUVECs	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
iHDAC	Inhibidores de desacetilasas de histonas
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
kpb	kilopares de bases
MOI	Multiplicidad de Infección
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear kappa B
OB	Cuerpo de oclusión
ODV	Virus derivado de oclusión
PECAM-1	Molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas-1
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA	Tricostatina A
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1

RESUMEN

La interacción entre células normales como fibroblastos, leucocitos y células endoteliales con células metastásicas, reproduce procesos de la reacción inflamatoria, donde el factor de transcripción NF- κ B, modula la expresión de genes involucrados en proliferación, apoptosis y activación endotelial. Para estudiar estos mecanismos, ha sido extensivo el uso de vectores virales como adenovirus y retrovirus para la introducción de cDNA a células endoteliales, obteniendo resultados relativamente satisfactorios; sin embargo, las eficiencias son bajas y también inducen reacciones asociadas a la inmunidad pre existente a virus humanos. Por tal motivo, el reciente empleo de vectores recombinantes derivados de virus que infectan insectos, ha sido una alternativa interesante. El uso de baculovirus episómicos como *Autographa californica* múltiple núcleopolihedrovirus (AcMNPV) modificado con casetes de expresión de mamíferos, constituye una nueva y segura opción para el estudio de innumerables procesos celulares, tales como la activación endotelial.

En este trabajo analizamos la respuesta del endotelio, luego de la transducción *in vitro* con un baculovirus recombinante, que contiene el cDNA que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Se evaluó la susceptibilidad de transducción de cultivos primarios de células de vena de cordón umbilical humano (HUVECS) por baculovirus. Mediante ensayos de citometría de flujo, se encontró un total de células infectadas mayor al 50 %. La capacidad adhesiva del fenotipo endotelial activado normalmente se asocia a la expresión de moléculas de adhesión (V-CAM 1, I-CAM 1 y selectina E), que se prueba con ensayos utilizando células U937; la transducción con baculovirus no incrementó la adhesión de células U937. Interesantemente, en nuestras células endoteliales infectadas con baculovirus sólo se indujo la expresión de I-CAM 1, sin incrementar las otras dos moléculas de adhesión, sugiriendo una activación parcial.

Concluimos que el sistema de expresión baculoviral, constituye una buena alternativa como vector de expresión en el estudio de la señalización que conduce a la activación endotelial.

ANTECEDENTES

1. Baculovirus

1.1 Generalidades

La familia *Baculoviridae*, entre los que se encuentran los baculovirus, está compuesta por virus de ADN con envoltura. Se caracterizan por tener una nucleocápside de forma alargada y asimétrica de 30-60 x 250 nm (Ihalainen, 2009) y un genoma circular de doble cadena que mide entre 80 y 180 kpb (Blissard, 1990). Los baculovirus son patógenos de artrópodos, en su mayoría del orden *Lepidoptera* (mariposas y polillas) (Blissard, 1996), aunque también pueden infectar *Hymenoptera* (abejas y hormigas), *Diptera* (moscas, mosquitos), *Coleoptera* (escarabajos) (Blissard y Rohrmann, 1990) y algunos crustáceos (Couch, 1973; Martignoni, 1986; Adam y McClintock 1991).

Los baculovirus se han nombrado de acuerdo con la especie de insecto de la que fueron aislados. Por ejemplo, el baculovirus mejor estudiado, aislado de la oruga de la hoja del alfalfa, es el virus de la polihedra múltiple nuclear (AcMNPV), que tiene un genoma de 134 kpb y codifica aproximadamente para 150 genes (Ayres *et al* 1994). Este virus se ha podido estudiar a nivel molecular, gracias a su capacidad de replicarse en las líneas celulares de insecto más comunes: Sf9 y Sf21AE, derivadas de tejido de ovario en pupa de la polilla *Spodoptera frugiperda* y BTI-Tn-5B1-4, derivada de homogenados de huevos de la oruga de la col *Trichoplusia ni* (Granados *et al*, 1994). Además de AcMNPV, el baculovirus que

infecta al gusano de seda *Bombix mori* (BmNPV), también ha sido estudiado, pero su uso es menos frecuente (Maeda *et al*, 1985).

1.2 La familia *Baculoviridae*: estructura y clasificación

Dentro de la familia *Baculoviridae* se pueden distinguir dos fenotipos, viriones derivados de oclusión (ODV) y viriones gemados (BV). Los ODV se encuentran embebidos en una matriz cristalina de proteínas, el cuerpo de oclusión (OB). Los ODV silvestres son capaces de iniciar una infección en el epitelio del intestino medio de los insectos. Por otro lado, los BV se producen luego de una infección inicial y geman a través de la membrana plasmática de las células infectadas, a la cual se insertan uno o más tipos de proteínas virales. Los BV contienen por lo general, una sola nucleocápside dentro de la envoltura, en contraste con los ODV que tienen una o múltiples nucleocápsides dentro de una envoltura (Jehle, 2006) (Figura 1).

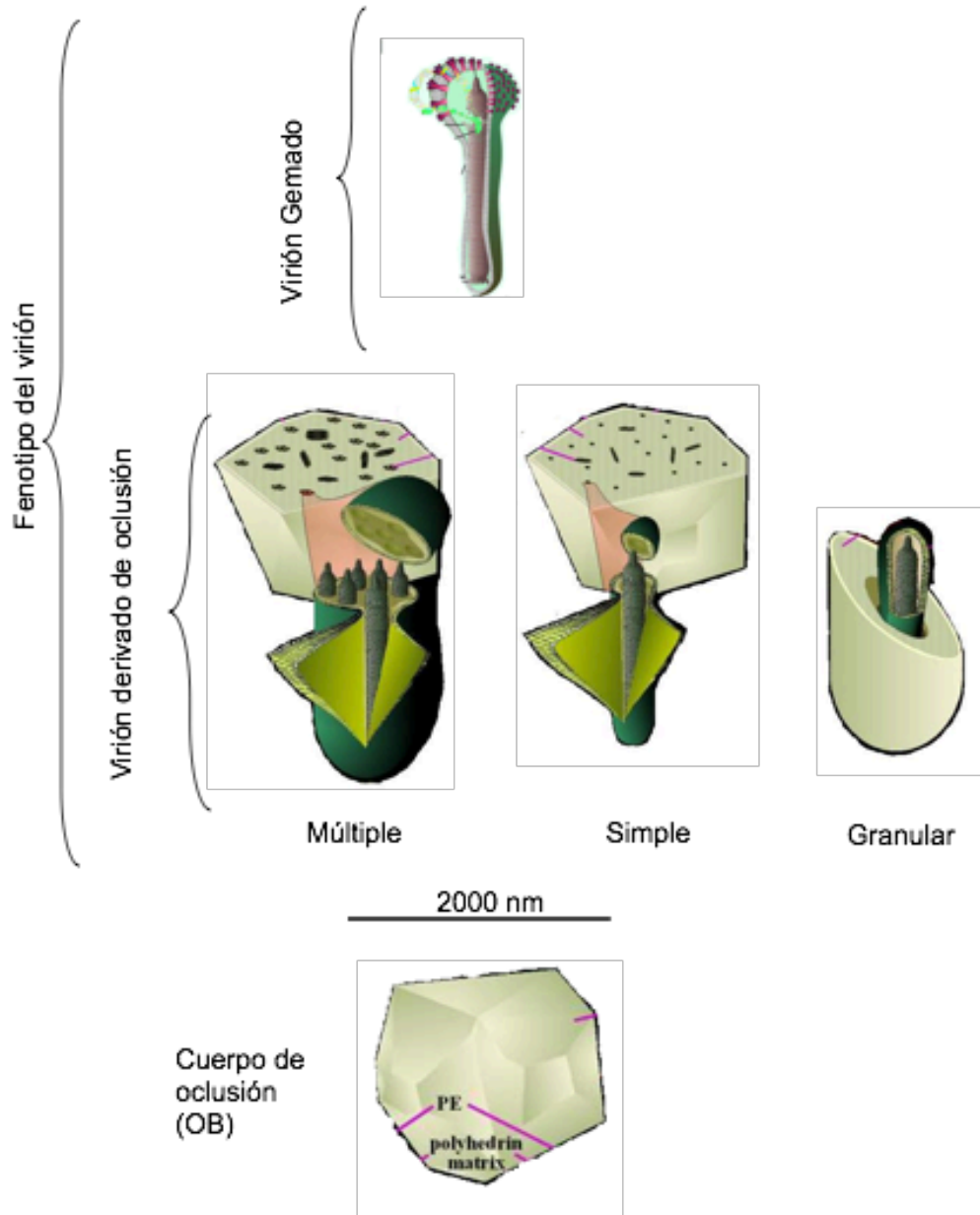


Figura 1. Fenotipos de baculovirus. (Modificada de Slack y Arif, 2007)

Han sido reportadas dos morfologías de los cuerpos de oclusión (OB) de baculovirus y concuerdan con la clasificación actual de baculovirus (Ackermann, 1983 y Volkman, 1995). En el género Nucleopolihedrovirus (NPVs), se producen cuerpos de oclusión de gran tamaño que contienen uno (S) o múltiples (M) nucleocápsides baciliformes envueltos en una bicapa lipídica, ambos tipos de cuerpos de oclusión se encuentran en el núcleo de las células infectadas (Rorhmann, 1999). Por otra parte, en el género granulovirus (GVs), se producen pequeños cuerpos de oclusión granulares que por lo general contienen un virión único y que hasta ahora sólo han sido encontrados en *Lepidoptera* (Winstanley y O'Reilly, 1999). Durante la infección por GVs, el núcleo se vuelve indistinguible y los cuerpos de oclusión se localizan esparcidos en el citoplasma (Okano, 2006). Esta clasificación fue aprobada por el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus en su sexto reporte (Volkman, 1995; Murphy, 1996) y desde entonces no ha sido cambiada (Blissard, 2000 y Theilmann, 2005). Sin embargo, la secuenciación de genes y genomas de cada vez más virus aplicada a fines taxonómicos (Tabla 1), sugiere la necesidad de una reevaluación de dicha clasificación. Jehle *et al* proponen los siguientes cuatro géneros:

- Alfabaculovirus: incluyen los nucleopolihedrovirus específicos de *Lepidoptera*. Pueden ser de nucleocápside única (SNPV) o múltiples (MNPV) y producen tanto BV como ODV. La proteína estructural más importante en estos virus es la polihedrina. El tamaño del OB es de 4-15 µm y el tamaño de su genoma va de 100 a 180 kpb. La especie representativa es: *Autographa californica* nucleopolihedrovirus (AcNPV)

- Betabaculovirus: incluye el género Granulovirus, específicos de *Lepidoptera*. La proteína estructural más abundante de estos virus es la granulina. Producen tanto BV como ODV. El tamaño de los OB es de 300-500 x 130-250 nm, y el tamaño de su genoma va de 100 a 180 kpb. El más representativo es: *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV).
- Gamabaculovirus: compuesto por virus específicos de *Hymenoptera* (NeleNPV y NesNPV). Tienen un OB polihédrico de 0.4-1.1 µm, con una nucleocápside envuelta en sus viriones. Su genoma es de 82-86 kpb. El fenotipo de cuerpo gemando BV puede estar ausente. Está representado por: *Neodiprion lecontei* nucleopolihedrovirus (NeleNPV).
- Deltabaculovirus: incluye a *Culex nigripalpus* nucleopolihedrovirus (CuniNPV) y posiblemente a otros baculovirus específicos del orden *Diptera*. Sus cuerpos de oclusión son globulares, de alrededor de 400 nm de diámetro, y están conformados por una proteína no homóloga a la polihedrina ni a la granulina de otros baculovirus.

Esta clasificación y los nuevos nombres propuestos a los géneros de la familia *Baculoviridae*, fueron determinados tomando en cuenta la evidencia filogenética y la composición del genoma, así como aspectos morfológicos y patológicos. La nueva propuesta tiene la ventaja de conservar los nombres de los virus según la especie de la cual fueron aislados. Además, el nombre del género es neutral en relación al hospedero; esto es esencial ya que futuros estudios genómicos podrían determinar que baculovirus de diferentes órdenes de insecto deberían ser filogenéticamente agrupados.

Tabla 1. Características de los genomas de baculovirus

Virus	Abreviatura	No. ORFs	Tamaño del genoma (pb)
Autographa californica MNPV	AcMNPV	155	133,894
Choristoneura fumiferana MNPV	CfMNPV	145	129,609
Choristoneura fumiferana	CfDEFNPV	149	131,160
Rachiplusia ou MNPV	RoMNPV	146	131,526
Bombyx mori NPV	BmNPV	143	128,413
Epiphyas postvittana NPV	EppoNPV	136	118,584
Orgyia pseudotsugata MNPV	OpMNPV	152	131,990
Adoxophyes honmai NPV	AdhoNPV	125	113,220
Agrotis segetum MNPV	AgseNPV	153	147,544
Chrysodeixis chalcites	ChChNPV	151	149,622
Helicoverpa armigera NPV (G4)	HearNPV (G4)	135	131,403
Helicoverpa armigera NPV (C1)	HearNPV (C1)	134	130,760
Helicoverpa zea SNPV	HzSNPV	139	130,869
Mamestra configurata NPV (A)	MacoNPV (A)	169	155,060
Mamestra configurata NPV (B)	MacoNPV (B)	168	158,482
Lymantria dispar MNPV	LdMNPV	166	161,046
Spodoptera exigua MNPV	SeMNPV	139	135,611
Spodoptera litura NPV	SpltNPV	141	139,342
Trichoplusia ni SNPV	TnSNPV	144	134,394
Cryptophlebia leucotreta GV	CrleGV	129	110,907
Cydia pomonella GV	CpGV	143	123,500
Phthorimea operculella GV	PhopGV	130	119,217
Plutella xylostella GV	PlxyGV	120	100,999
Adoxophyes orana GV	AdorGV	119	99,657
Xestia c-nigrum GV	XecnGV	181	178,733
Agrotis segetum GV	AgseGV	132	131,680
Neodiprion lecontei NPV	NeleNPV	90	81,756
Neodiprion sertifer NPV	NeseNPV	90	86,462
Culex nigripalpus NPV	CuniNPV	109	108,252

*Modificado de Jehle *et al* 2006

1.3 Aplicaciones tradicionales de baculovirus

El primer reporte de la aplicación de baculovirus fue para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto (Smith *et al*, 1983; Pennock *et al*, 1984 y Luckow *et al*, 1988). Desde entonces, su desarrollo ha resultado en sistemas de expresión virales seguros para el humano, incapaces de infectar insectos silvestres y fáciles de usar. Estos sistemas han permitido purificar numerosas proteínas recombinantes a gran escala en células de insecto (Kost *et al*, 2005).

El principio que rige este sistema de expresión, es la recombinación homóloga entre el ADN genómico del virus y un plásmido de transferencia que contiene el ADNc que codifica para la proteína deseada; ambos son cotransfectados en las células de insecto y producen una mezcla de virus recombinantes y parentales. En un inicio, la forma de identificar las clonas recombinantes, era observar en un ensayo de formación de placas de lisis aquellas con un fenotipo con cuerpo de oclusión negativo. Sin embargo, la baja frecuencia de recombinación dificultaba la identificación de las placas recombinantes. Por tal motivo, una importante mejoría al sistema, fue el desarrollo de un ADN genómico de baculovirus línearizado con el sitio único Bsu36I en el locus de polihedrina, con lo que se aumentó la frecuencia de obtención de recombinantes, pues los genomas linearizados no son infecciosos (Kitts *et al*, 1990).

El sistema de expresión de proteínas que utiliza baculovirus recombinantes ha sido de gran utilidad, en general, porque en las células de insecto, las proteínas

recombinantes se pueden plegar, modificar, transportar y ensamblar, para producir productos solubles mediante mecanismos muy similares a los que se llevan a cabo en células de mamífero (O'Reilly *et al*, 1992). La mayoría de las modificaciones post traduccionales, como fosforilación, acetilación, amidación etc., ocurren de igual manera que en las células de mamífero. Hasta ahora, se sabe que otras modificaciones post traduccionales como la glicosilación sí ocurre de manera distinta y por tal motivo, se han generado líneas celulares transgénicas para resolver este problema (Jarvis *et al*, 2003).

De manera paralela, surgió un gran interés en el estudio de baculovirus por su potencial para ser usados en el control de plagas de larvas de mariposas, ya que algunas especies como *Pseudoplusia includens*, causan daños importantes en la producción de semillas en la agricultura, plantas de ornato y bosques (Lorna *et al*, 1990; Moscardi *et al*, 1999 y Alexandre *et al*, 2010). Las preocupaciones de bioseguridad en el uso de vectores baculovirales incluyen, por una parte las relacionadas con el posible daño a ecosistemas y por otro, el riesgo de que estos vectores pudieran infectar células humanas o a otras especies silvestres y domesticadas. Por tal motivo, surgió la necesidad de estudiar las interacciones entre los baculovirus y células que tradicionalmente no se consideraban como blancos del virus, como las de mamífero. Estudios iniciales contemplaban la posibilidad de que los baculovirus se replicaran en células CHO (McIntosh *et al*, 1980), sin embargo, aunque se ha demostrado que los virus pueden entrar a células de mamífero (Volkman *et al* 1983), también se sabe de su incapacidad para replicarse productivamente una vez dentro de estas (Hartig *et al*, 1992; Tjia

et al, 1983 y Carbonell *et al*, 1985).

2. Tranferencia de material genético mediado por baculovirus en células de mamífero

La introducción de material genético mediado por virus en células eucariontes ha sido una herramienta muy valiosa para comprender los mecanismos moleculares que rigen su fisiología celular. Una de las metas principales en este campo, es contar con vectores para terapia génica en humano. Sin embargo, se ha requerido de una amplia gama de vectores para lograr este objetivo. En la búsqueda de nuevas alternativas funcionales, seguras y fáciles de emplear, se ha propuesto el uso de virus modificados en células de mamífero que normalmente no sean permisivas a la infección viral.

A mediados de los años noventa, tomando como base la tecnología del sistema de expresión de baculovirus recombinantes y la información previa sobre la capacidad de estos virus de entrar en células de mamífero, dos grupos independientes reportaron por primera vez, que baculovirus modificados podían ser usados para introducir y expresar genes reporteros en células hepáticas. La modificación de estos baculovirus que les permite expresar un reportero, consiste en agregar un casete de expresión de mamífero, conocido comúnmente como BacMam, el cual contiene un gen reportero bajo el control de un promotor funcional en células de mamífero (Kost *et al*, 2005).

Hofmann *et al* y Boyce *et al*, usaron baculovirus con la modificación BacMam en hepatocitos primarios, líneas de hepatomas y distintas líneas

celulares de origen no hepático. Los virus, que contenían el gen de luciferasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) y el gen de β -galactosidasa bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), se internalizaron al citoplasma celular y al núcleo expresaron los reporteros de manera eficiente. Sin embargo, se observó que la actividad transcripcional de los promotores empleados en líneas como COS-1, T-47D y HEK 293 fue baja, mientras que en las líneas celulares HeLa, CHO, NIH3T3 y CV-1 la actividad de los reportero fue apenas perceptible. No obstante, todas las líneas celulares utilizadas incorporaron cantidades similares de partículas virales, con lo que se concluyó que la falta de expresión se debía a eventos subsecuentes a la entrada del virus en la célula (Hofmann *et al*, 1995; Boyce *et al*, 1996). Una explicación adicional a este fenómeno fue la fuerza del promotor, ya que posteriormente se demostró que en las líneas COS-7, HeLa y células renales de cerdo, el cambio del promotor de CMV por una fusión del promotor de β -actina de pollo con el promotor CAG (potenciador inmediato temprano de CMV) generó altos niveles de expresión (Shoji *et al*, 1997).

El descubrimiento y la aplicación de la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero, permitió evaluar la expresión *in vivo* y en tiempo real sin necesidad de fijar a las células o a los tejidos. La GFP mostró ser un buen reportero en los sistemas BacMam en un amplio panel de células de mamífero, que iban desde líneas derivadas de riñón como BHK y HEK 293 hasta células de origen neuronal como SK-N-MC. Sólo en las células de origen hematopoyético como THP-1 y U937 el nivel de expresión de la GFP continuó siendo muy bajo. A

pesar de esto, en todas las líneas celulares probadas, la producción de GFP incrementó al agregar inhibidores de desacetilasas de histonas, como butirato de sodio y tricostatina A (TSA) (Condreay *et al*, 1999). Estos datos y estudios posteriores sugieren que el ADN del virus es susceptible, directa o indirectamente, al silenciamiento por acetilación de histonas (Hsu CS *et al*, 2004). Luego de estos hallazgos que condujeron al uso cotidiano de inhibidores de desacetilasas de histonas en las transducciones con sistemas BacMam, la lista de líneas celulares de mamífero susceptibles a baculovirus ha ido en aumento (Tabla 2).

A pesar de mostrar eficiencia en una amplia variedad en líneas celulares, los estudios con baculovirus no se han limitado a mamíferos, pues se ha demostrado que estos vectores también son capaces de transducir células de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* utilizando el promotor de Hsp70 (Lee *et al*, 2000) o embriones de pez cebra (*Danio rerio*) (Wagle *et al*, 2003).

Tabla 2. Líneas celulares susceptibles a transducción por baculovirus

Tipo celulares	Referencias
Células humanas	
HeLa	Condreay <i>et al</i> , 1999; Sarkis <i>et al</i> , 2000
Huh7	Hofmann <i>et al</i> , 1995; Condreay <i>et al</i> , 1999
HEK 293	Boyce <i>et al</i> , 1996; Condreay <i>et al</i> , 1999
HepG2	Hofmann <i>et al</i> , 1995; Boyce <i>et al</i> , 1996
KATO-III	Shoji <i>et al</i> , 1997
IMR32	Shoji <i>et al</i> , 1997
MT-2	Shoji <i>et al</i> , 1997
CHP212	Sarkis <i>et al</i> , 2000
W12	Condreay <i>et al</i> , 1999
FLC4	Tani <i>et al</i> , 2001
143TK-	Ye <i>et al</i> , 2000
DLD-1	Yap <i>et al</i> , 1997
MRC5	Ye <i>et al</i> , 2000
MG63	Condreay <i>et al</i> , 1999
Células de primate	
COS-7	Yap <i>et al</i> , 1997; Condreay <i>et al</i> , 1999
CV-1	Condreay <i>et al</i> , 1999
Vero	Airenne <i>et al</i> , 2001
Células de roedor	
CHO	Condreay <i>et al</i> , 1999, Tani <i>et al</i> , 2001
BHK	Condreay <i>et al</i> , 1999, Tani <i>et al</i> , 2001
RGM I	Shoji <i>et al</i> , 1997
PC12	Shoji <i>et al</i> , 1997, Condreay <i>et al</i> , 1999
N2a	Sarkis <i>et al</i> , 2000
L929	Airenne <i>et al</i> , 2001

Continuación de la Tabla 2. Líneas celulares susceptibles a transducción por baculovirus

Tipo celulares	Referencias
Células porcinas	
CPK	Airenne <i>et al</i> , 2001
FS-L3	Airenne <i>et al</i> , 2001
PK-15	Airenne <i>et al</i> , 2001
Células de bovino	
MDB	Airenne <i>et al</i> , 2001
BT	Airenne <i>et al</i> , 2001
BUVEC	Luz Madrigal <i>et al</i> , 2007
Células de ovino	
FLL-YFT	Airenne <i>et al</i> , 2001

(Modificado de Kost, 2005)

Otro de los motivos por los cuales el uso de baculovirus como vectores se ha incrementado, radica en las ventajas intrínsecas a sus propiedades, que los convierten en una herramienta segura y eficiente, comparados con sistemas virales de mamífero (Tabla 3). Su uso se ha extrapolado no solo a líneas celulares inmortalizadas, sino también a cultivos primarios, en donde la inserción de material genético mediada por otros vectores virales ha sido complicada (Tabla 4).

Tabla 3. Ventajas del uso de baculovirus

Propiedades Generales

La expresión del transgen es transitoria

El nivel de expresión es dependiente del título viral

Transducción por partículas virales en suspensión (susceptible a automatización)

Estable a 4 °C en la oscuridad

Capacidad de albergar insertos de cADN muy grandes

Capacidad de transducir una amplia variedad de cultivos primarios

Capacidad de trasducción múltiple (más de dos virus a la vez)

Baja citotoxicidad

Perfil de bioseguridad

Agente de grupo de riesgo 1 (el menor riesgo dentro de la clasificación)

Producidos en insectos o en células de insecto, incapaces de replicarse en células de mamífero

No se sabe que causen enfermedad en humanos

Se inactivan por el complemento humano

Los virus replicados en el laboratorio no pueden replicarse en el ambiente

*Modificado de Kost *et al*, 2007

Tabla 4. Cultivos primarios susceptibles a transducción por baculovirus

Tipo celular	Referencias
Hepatocitos de humano y de rata	Hofmann <i>et al</i> , 1995; Boyce <i>et al</i> , 1996
Islotes pancreáticos	Ma <i>et al</i> , 2000
Queratinocitos	Condreay <i>et al</i> , 1999
Fibroblastos de médula ósea	Condreay <i>et al</i> , 1999
Fibroblastos de prepucio	Condreay <i>et al</i> , 1999
Condrocitos	Lee <i>et al</i> , 2007
Mioblastos	Shen <i>et al</i> , 2008
Células de Schwann de rata	Kenoutis <i>et al</i> , 2006
Células de riñón de ratón	Liang <i>et al</i> , 2004
Osteoclastos	Tani <i>et al</i> , 2003
Hipocampo	Tani <i>et al</i> , 2003
Cerebelo	Tani <i>et al</i> , 2003
Células troncales mesenquimales	Ho <i>et al</i> , 2005; Zeng <i>et al</i> , 2007
Células endoteliales humanas	Reportado en esta tesis

3. El endotelio vascular y la reacción inflamatoria

3.1 Estructura y fisiología del endotelio

El endotelio es la monocapa de células estratégicamente localizada entre la sangre y los tejidos. Las células endoteliales que lo conforman recubren el árbol vascular y linfático. La monocapa de células endoteliales es en realidad un epitelio modificado sobre una lámina basal (Mantovani y Garlanda, 2002). Se caracteriza por la expresión del factor de Von de Willebrand (factor asociado al factor VIII de la coagulación), presente en vesículas apicales en forma de bastones llamados cuerpos de Weibel-Palade (Sakariassen, 1979). La disposición y organización estructural de las células endoteliales es fundamental para llevar a cabo funciones como la extravasación de células y el tráfico de moléculas.

Pese a que por muchos años se consideró al endotelio como una barrera pasiva e inerte, numerosos estudios han demostrado que por el contrario, su metabolismo puede pasar de un estado de reposo a una condición activa, asociada a la inflamación, la coagulación, el control local tono vascular y del intercambio de fluidos y solutos. Por estas funciones especializadas y su vasta extensión, hoy es considerado como un órgano (Augustin *et al.*, 1994 y Risau, 1995). Mediante su capacidad de captar y responder a los estímulos de su ambiente local, censa los requerimientos fisiológicos de los tejidos vecinos, la necesidad de sobrevivencia y/o la capacidad de autoregeneración en dicho microambiente (William, 2007 y Pries *et al.*, 2000). Por ejemplo, en respuesta a daño tisular, la hipoxia guía procesos de neovascularización asociados a la

reconstrucción del tejido. Las alteraciones del endotelio son críticas en patologías como diabetes, artritis reumatoide, aterosclerosis, angiogénesis de la microvasculatura de la retina, angiogénesis tumoral y metastasis de células cancerosas (Goldberg, 2009; Dhaouadi *et al.*, 2007; Sima *et al.*, 2009; Clapp *et al.*, 2008 y McSherry *et al.*, 2007). Esta diversidad de funciones ha motivado estudios moleculares y celulares que permitan una mejor comprensión de los mecanismos que rigen su funcionamiento normal y de los desajustes en los estados patológicos.

3.2 La reacción inflamatoria y los cambios en el fenotipo endotelial

La inflamación es la respuesta caracterizada por el reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo a un órgano o tejido dañado, ya sea por un trauma, una infección o una reacción autoinmune (Michiels, 2003). Durante la inflamación, en su forma aguda, se presenta dolor, calor, rubor y edema. A nivel microscópico, implica la dilatación de arteriolas, capilares y vénulas, con una disminución del flujo sanguíneo y un incremento en la permeabilidad. Además, la membrana apical de las células endoteliales sufre modificaciones estructurales que facilitan la adhesión y migración de los leucocitos al foco inflamatorio (Nathan, 2002). El endotelio además libera citocinas y factores de crecimiento, que sirven como señales de comunicación (Muller, 2002).

El endotelio en un adulto normal presenta un metabolismo basal muy lento, caracterizado por un bajo consumo de glucosa y una síntesis reducida de proteínas, por lo que se considera en estado quiescente o de reposo. Bajo esta

condición el recambio de las células endoteliales es muy lento. Las membranas apicales de las células endoteliales en reposo constituyen una superficie no trombogénica y no adherente, sobre la cual se expresan, en bajos niveles, las moléculas de adhesión ICAM-1 y PECAM-1. El endotelio en su estado basal, también expresa factores como el de von Willebrand (vWF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Esquivel Chirino, 2007). Este equilibrio se rompe cuando ocurre un daño inducido por traumatismos, agentes químicos o patógenos. Por ejemplo, las bacterias Gram (+) y (-) y sus productos interactúan con las células endoteliales y monocitos, que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los denominados receptores tipo Toll (TLRs) (Mogensen, 2009). El mejor estudiado de los PAMPs es el lipopolisacárido de *E. coli*, que induce la liberación de citocinas y el endotelio pasa de un fenotipo quiescente a uno activado (Figura 2). Las citocinas mediadoras de la activación son principalmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina-1 (IL-1) y los interferones (IFN) (Mantovani *et al.*, 1997), pero también se reconoce la participación de la IL-2, IL-4, IL-6, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). (Cotran y Pober, 1990; Dauphinee y Karsan, 2006). Las células endoteliales no sólo son activadas por las citocinas, sino que también pueden sintetizarlas y secretarlas cuando cambian al fenotipo activado. TNF α , IL-1 e IL-6 son parte del repertorio de citocinas proinflamatorias producidas por el endotelio que actúan de modo autocrino y paracrino para amplificar las señales proinflamatorias. Como respuesta a estas señales, el endotelio expresa factores de coagulación, receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, además, cambia el

arreglo de su citoesqueleto, funciona como una superficie trombogénica y se torna adhesivo para las células sanguíneas (Pober, 2002 y Ahn *et al.*, 2003). Las moléculas que forman parte de fenotipo adhesivo del endotelio, pertenecen a tres familias: las selectinas, las integrinas y la súper familia de las inmunoglobulinas (Dittmar *et al.*, 2008).

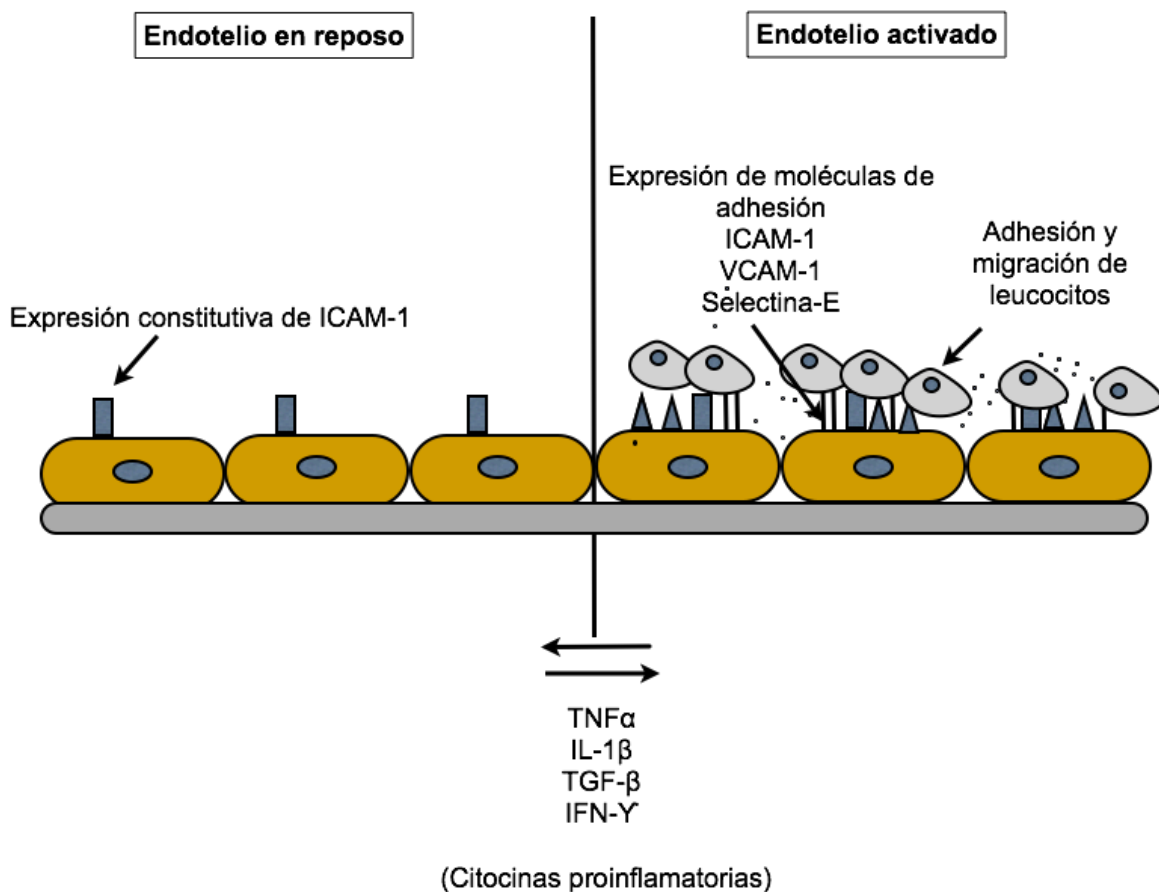


Figura 2. Fenotipos de las células endoteliales. El endotelio pasa de un estado en reposo a uno activado al recibir el estímulo de las citocinas proinflamatorias. Este cambio de fenotipo es reversible.

A pesar de que la activación se caracteriza por cambios en los patrones de expresión génica que le permiten a las células endoteliales adaptarse a los nuevos requerimientos locales, estos cambios no representan un proceso de diferenciación como tal, pues son reversibles (Cook-Mills *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2003 y Unger *et al.*, 2002).

Al inicio de la inflamación, los neutrófilos en la circulación, son atraídos por los gradientes quimiotácticos de las quimiocinas liberadas por los macrófagos reclutados en el tejido. Después de los neutrófilos, varios tipos de leucocitos y otras células inflamatorias son activadas y atraídas hacia el sitio inflamado por una red de señales que involucran un gran número de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (Lu H *et al.*, 2006). El endotelio es la primera barrera que deben atravesar los neutrófilos para llegar al sitio de inflamación, por tal motivo juega un papel muy importante en este proceso. Los neutrófilos en el torrente sanguíneo, en un inicio, se adhieren en forma laxa al endotelio activado por medio de interacciones de baja afinidad entre las selectinas y las moléculas de adherencia similares a mucina o a lactosaminoglicanos sialilados presentes sobre la membrana de los neutrófilos (Vestweber, 2000 y Ley, 2002). Las interacciones entre la selectina-E, específica del endotelio, la selectina-P, en el endotelio y en las plaquetas y la selectina-L, en los leucocitos, son débiles y ceden a la fuerza del flujo sanguíneo. Este proceso se repite acercando a los neutrófilos al glicocáliz endotelial, que saltan de a lo largo membrana apical y gracias a esto interaccionan cada vez con un mayor número de selectinas, lo cual reduce su velocidad. A esta etapa se le conoce como rodamiento (Finger *et al.*, 1996; Bevilacqua *et al.*, 1989;

McEver *et al.*, 1989). El rodamiento es mediado en un inicio por la selectina-L, pues se expresa de manera constitutiva. La selectina-E es transcripcionalmente inducida por TNF α , IL-1 o LPS y los cuerpos de Weibel-Palade se fusionan con la membrana apical del endotelio y liberan la selectina-P almacenada (Klein *et al.*, 1995 y Mantovani *et al.*, 1992). Ambas selectinas sobresalen del glicocáliz endotelial. Durante el rodamiento los leucocitos son activados por acción de quimiocinas como IL-8 y MIP -1 β (proteína inflamatoria de macrófagos) ancladas en el glicocáliz de las células endoteliales, así como factores como el PAF (factor activador de plaquetas) y productos de la cascada del complemento (C5a, C3a y C5b67) (Tanaka *et al.*, 1993). La interacción de los quimioatrayentes con los receptores membranales de los leucocitos, activa señales mediadas por proteínas G que provocan que las integrinas aumenten su afinidad por las CAMs de la súper familia de las inmunoglobulinas endoteliales y ambas se unan. El paro y adherencia firme de los leucocitos se produce gracias a la expresión inducida de ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 y VCAM-1 (Prescott *et al.*, 2001). Los leucocitos, una vez adheridos a la superficie, migran a través de las uniones intercelulares del endotelio hacia los tejidos, en un proceso regulado por la liberación de calcio, la PECAM-1, así como proteasas liberadas por los leucocitos. Las etapas de la migración transendotelial y la manera detallada en que ésta se dirige, aún no han sido completamente esclarecidas. Los neutrófilos son los primeros en infiltrarse al tejido dañado, seguidos por monocitos y linfocitos (Figura 3) (Su *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 1990 y Duncan *et al.*, 1999).

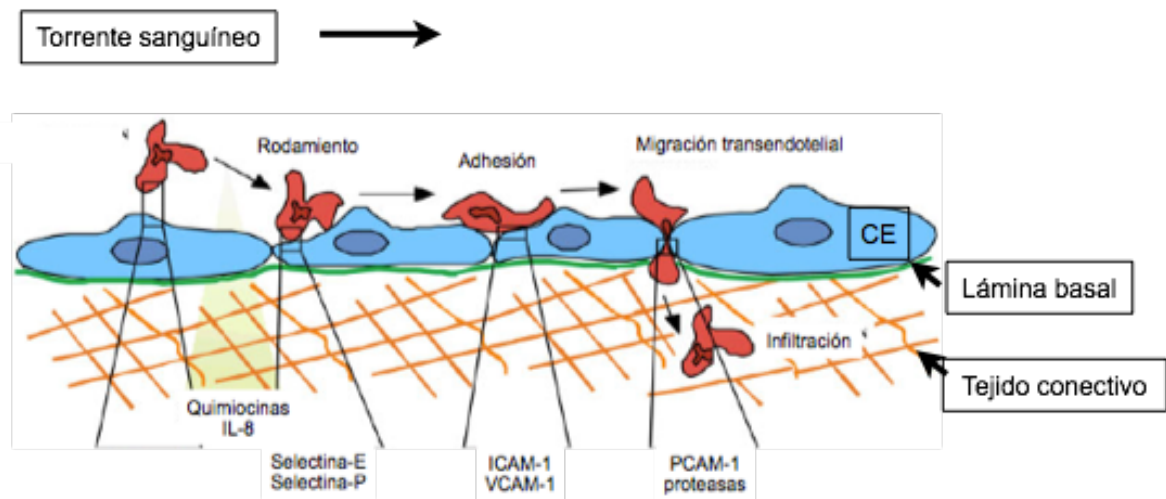


Figura 3. Etapas de la migración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos. Durante la reacción inflamatoria, los leucocitos ruedan, luego se activan y se adhieren al endotelio, seguido de esto, transmigran a través del endotelio. Se muestran algunas de las moléculas involucradas en cada etapa (Modificado de Michiels, 2003).

4. La vía de señalización de NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B fue descubierto como parte de la maquinaria de transcripción de los genes de la cadena κ de las inmunoglobulinas en linfocitos B (de ahí su nombre). Actualmente se le reconoce un papel privilegiado en la señalización de una gran variedad de fenómenos celulares. El sistema NF- κ B participa en la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la respuesta inmunológica, por lo que su activación es crucial tanto para la secreción de productos proinflamatorios por parte de los macrófagos, como para la activación endotelial (Baeuerle *et al.*, 1996). También participa en el control de la proliferación celular y sobrevivencia (López-Bojorquez, 2004a y Baeuerle *et al.*, 1996). NF- κ B es expresado prácticamente en todas las células de mamífero y puede ser activado por una amplia variedad de estímulos. Aunque NF- κ B participa en la fisiología de la respuesta inmune, su activación constitutiva se ha asociado con distintos tipos de cáncer y otras enfermedades como diabetes, inflamación crónica y enfermedades cardiovasculares (Caamaño y Hunter, 2002; Pikarsky *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2004 y Rudofsky *et al.*, 2004).

NF- κ B es un homo o heterodímero formado por dos subunidades proteicas que se agrupan dentro de la familia Rel, que en mamíferos está constituida por: p65 (también denominada RelA), c-Rel, RelB, p105 (la cual es la precursora de p50) y p100 (precursora de p52). Todas las proteínas de esta familia tienen un dominio conservado de 300 aminoácidos en el extremo N llamado Rel, que es

responsable de la dimerización, la unión a ADN y la interacción con las proteínas inhibidoras IκBs.

Los dímeros NF-κB forman al factor de transcripción activo que regula la expresión genética al unirse a secuencias específicas localizadas en la región promotora de los genes blanco (Müller y Harrison, 1995 y Ghosh *et al.*, 1998). De las diversas combinaciones de dímeros, el más abundante y el mejor estudiado es el que forman p50 y p65 (Moynagh, 2005).

En las células endoteliales en estado quiescente, NF-κB se encuentra predominantemente en el citoplasma, unido a una de las proteínas inhibidoras. En las células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs), se han descrito únicamente tres inhibidores del factor nuclear κB (IκB): IκBα, IκBβ e IκBε (López-Bojorquez, 2004a). Estas proteínas inhibidoras, interaccionan con el dímero NF-κB a través de repeticiones múltiples del dominio semejante a ankirina y mantienen al factor transcripcional secuestrado en el citoplasma, ya que ocultan su secuencia de localización nuclear (Ghosh *et al.*, 1998). Durante la reacción inflamatoria, las citocinas (TNFα e IL-1 principalmente) estimulan a las células endoteliales y provocan la activación de NF-κB. Sin embargo, otros estímulos también pueden provocar la activación del factor, por ejemplo: mitógenos como ésteres de forbol (PMA) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), componentes de agentes infecciosos como LPS, el daño celular por radiación UV y/o estrés oxidativo (López-Bojorquez, 2004b).

En la vía clásica de NF-κB (Figura 4), los estímulos de citocinas proinflamatorias promueven la activación de las cinasas de IκB (IKKs), que

fosforilan dos residuos conservados de serina (S32/36) de las moléculas de I κ B α . Esta fosforilación de I κ B α , permite su inmediata poliubiquitinación por el complejo SCF- β -TrCP y marca así a la proteína para ser reconocida y degradada por la subunidad 26 S del proteasoma, lo que permite la traslocación del NF- κ B al núcleo. Una vez en el núcleo, NF- κ B se une a los elementos de respuesta κ B en la región promotora de distintos genes como los marcadores de activación endotelial Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 y se inicia su transcripción (Tabla 4) (Collins *et al.*, 1995 y Xiao, 2004).

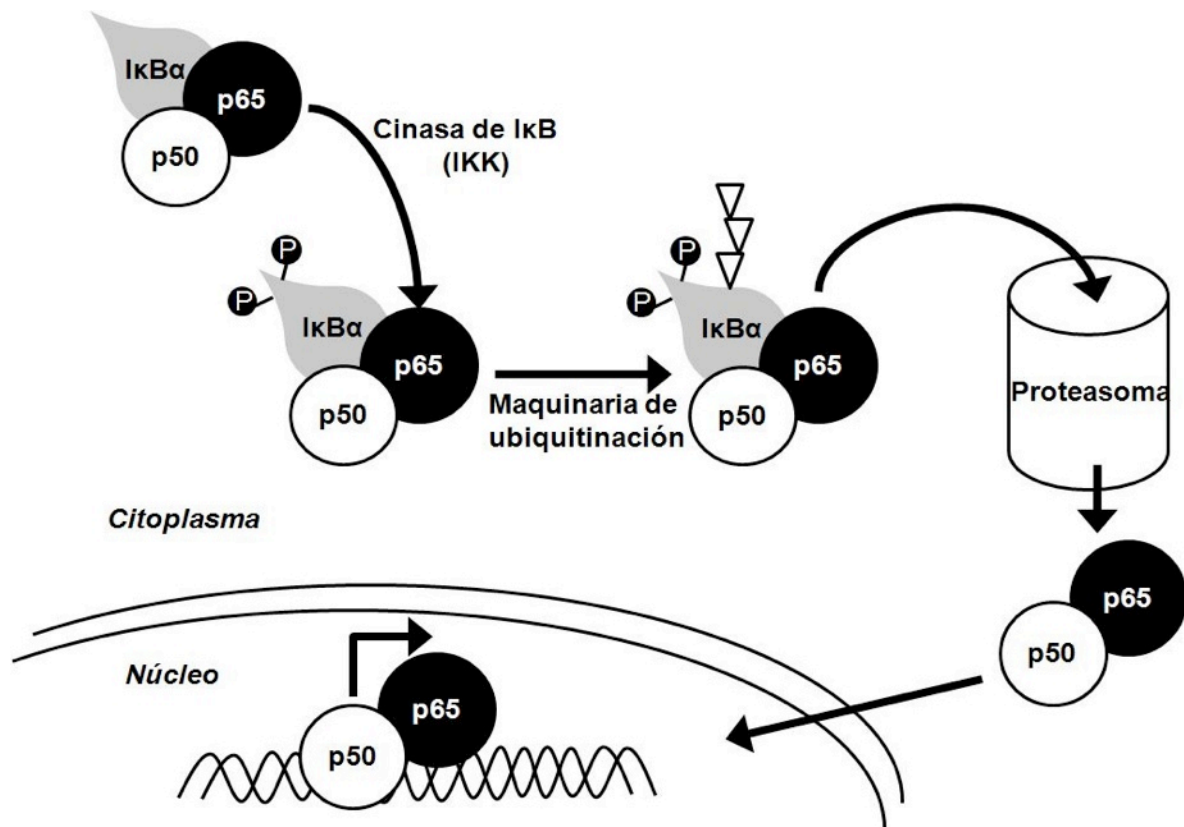


Figura 4. Activación de NF- κ B por la vía clásica. Los estímulos que activan a la cinasa de I κ B marcan a I κ B α con fosforilaciones (S32/36). Esta señal promueve su ubiquitinación y subsecuente degradación en el proteasoma. El factor activo se trasloca al núcleo, donde se une a elementos de respuesta e inicia la transcripción de genes como los que codifican para moléculas de adhesión (CAMs).

Tabla 5. Marcadores inducibles de activación endotelial

Marcador	Tipo celular	Estímulo
ICAM-1	CE, leucocitos, epitelio, fibroblastos	Citocinas proinflamatorias
VCAM-1	CE, macrófagos, células dendríticas, mesotelio	Citocinas proinflamatorias
Selectina-E	CE, vénulas postcapilares	Citocinas proinflamatorias
Selectina-P	CE, plaquetas	Citocinas proinflamatorias
VEGFR-2	CE	Neoangiogénesis, SK
VEGFR-1	CE	Neoangiogénesis, SK

*Modificado de Garlanda, 1997. SK: Sarcoma de Kaposi

JUSTIFICACIÓN

La modificación de la expresión génica en células y en organismos completos es hoy una valiosa herramienta en la comprensión de los procesos de señalización que determinan el fenotipo celular. Si bien existen modelos celulares como las células CHO o HEK 293T que se pueden transfectar fácilmente, los cultivos primarios de células animales o humanas son relativamente resistentes a la introducción de vectores de expresión clásicos. En los últimos años y con el fin de resolver este problema, se ha explorado el uso de sistemas virales modificados como sistemas de expresión con los que se puede introducir el cDNA de interés en cultivos primarios; entre estos sistemas se encuentran oncoretrovirus, lentivirus, adenovirus, virus asociados a adenovirus (AAV), herpes simplex virus-1, así como híbridos de los anteriores (Thomas *et al.*, 2003). En el desarrollo de estos sistemas se busca siempre obtener la mayor eficiencia posible (porcentaje de células que expresan la proteína de interés), baja toxicidad, facilidad en su producción y seguridad en su manejo, así como un amplio espectro de aplicación.

Uno de los sistemas celulares en donde la introducción de material genético ha resultado difícil es el endotelio vascular. Las células endoteliales y de músculo liso que se pueden obtener del cordón umbilical humano en partos y cesáreas de embarazos normales, representan modelos experimentales útiles para estudiar la fisiología y fisiopatología del endotelio vascular. Si bien, existen líneas inmortalizadas de HUVECs como HMEC-1, BUVEC o de microvasculatura (Takahashi, 1990; Lassalle, 1992 y Pouchard, 1994), éstas carecen de marcadores

específicos del endotelio como el factor de Von Willebrand. Por lo anterior, existe un gran interés en la manipulación molecular *in vitro* de células endoteliales humanas primarias, utilizando vectores derivados de virus humanos antes mencionados. Sin embargo, los procedimientos reportados hasta ahora tienen eficiencias bajas y además inducen la activación de las células endoteliales (Bowen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Rafii *et al.*, 2001; Stark *et al.*, 1996 y Maruve, 2004). Nuestro grupo ha buscado transfectar las HUVECs con las estrategias convencionales sin alcanzar eficiencias mayores al 30%.

Por lo anterior, en años recientes se ha comenzado a explorar el potencial de sistemas virales modificados ajenos a los mamíferos, como es el caso de baculovirus recombinante en la transducción de una gran variedad de líneas celulares e incluso células primarias, incluyendo células humanas (Hofmann *et al.*, 1995; Schütz *et al.*, 2006; Kost *et al.*, 2005; Sarkiset *et al.*, 2000; Lackner *et al.*, 2008 y Zeng *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha, no existen reportes sobre el uso de baculovirus en cultivos primarios de células endoteliales humanas y su potencial para inducir un fenotipo endotelial activado. En esta tesis se presenta un sistema de transducción de HUVECs mediada por baculovirus evaluando la eficiencia y el fenotipo endotelial activado.

HIPÓTESIS

La inserción de genes mediada por baculovirus modificados tiene una alta eficiencia y no activa a las células endoteliales humanas primarias, por lo que representa una herramienta útil para el estudio de los mecanismos de señalización endotelial.

OBJETIVO

General:

Caracterizar la eficiencia de transducción y la respuesta en cultivos primarios de células endoteliales humanas a la inserción de material genético mediada por baculovirus modificados.

Particulares:

- Optimizar la eficiencia de transducción mediada por baculovirus que expresen la proteína verde fluorescente (GFP) en cultivos primarios de células endoteliales humanas derivadas de la vena del cordón umbilical.
- Evaluar la adhesión de células U937 (H³) a cultivos de células endoteliales infectadas por baculovirus como una medida de su estado de activación.
- Evaluar la expresión de moléculas marcadoras de activación endotelial como ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E, en respuesta a la transducción mediada por baculovirus o al estímulo con TNF α como control.
- Construir un baculovirus recombinante funcional capaz de inhibir la vía clásica de NF- κ B, mediante la forma dominante negativa de I κ B α contenida en un casete de expresión controlado por el promotor de citomegalovirus (CMV) y marcado con el epítipo Flag.

MATERIAL Y MÉTODOS

Células y Cultivo

Obtención y cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

Los cordones umbilicales fueron colectados en PBS pH 7.4 con antibiótico-antimicótico (penicilina G 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL y 250 ng anfotericina B/mL) (In vitro SA, México) y almacenados a 4 °C hasta el momento de ser procesados. Las células endoteliales fueron obtenidas de acuerdo al protocolo descrito por Jaffe en 1974 al canular la vena del cordón y realizar una digestión enzimática con colagenasa tipo II (Worthington, USA) al 0.02% disuelta en amortiguador de digestión durante 15 min a 37 °C. Después de la incubación, cada cordón recibió un suave masaje con la finalidad de separar la monocapa endotelial de la lámina basal. El volumen de la colagenasa inyectado en la vena fue recolectado en tubos Falcon de 50 mL con 5 mL de suero de ternera (Invitrogen, USA) para inactivar la enzima. El volumen obtenido fue centrifugado a 1,500 x g durante 10 min y el sobrenadante fue eliminado. La pastilla producto de 3-4 cordones, fue resuspendida en medio M199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, USA), L-glutamina 2mM (Sigma, USA), Heparina 5 U/mL (Tecnofarma, México), Factor de Crecimiento Endotelial 10 µg/mL (BTI, USA) y sembrada en una caja de Petri de 100 mm (Corning, USA). Las células se incubaron en condiciones standard (37 °C, 5 % de CO₂ y a una atmósfera saturada de H₂O). Veinticuatro h después de ser sembradas, las células fueron

lavadas 3 veces con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y se agregó nuevo medio M199 suplementado. Las células se cultivaron hasta un 80 % de confluencia y fueron expandidas hasta un total de 2 pasajes antes de sembrarse para los experimentos.

Cultivo de líneas celulares de mamífero

Las células U937 (pro-monocítica) y HEK 293T fueron crecidas en medio RPMI y DMEM respectivamente (Invitrogen, USA) suplementados con 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen, USA) y antibiótico - antimicótico (In vitro SA, México). Las líneas celulares se incubaron en condiciones standard (37 °C, 5 % de CO_2 y a una atmósfera saturada de H_2O).

Cultivo de células de insecto

Para obtener y amplificar los baculovirus recombinantes se utilizaron las células Sf9 derivadas de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen, USA). Las células se cultivaron en medio Grace's (Sigma, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen, USA), extracto de levadura 1X (Sigma Aldrich, USA), lactalbúmina (Sigma, USA) 1X y antibiótico - antimicótico (Invitrogen, USA). Las células adheridas fueron cultivadas en una estufa a 27 °C. A las células en suspensión se les agregó ácido plurónico F68 al 0.1 % (Invitrogen, USA) y se mantuvieron en agitación a 100 rpm y 27 °C. El cultivo de estas células se realizó en el laboratorio del Dr. Luis Vaca en el Instituto de Fisiología Celular.

Construcción y análisis de plásmidos

El plásmido pBacCMV DN fue generado mediante la ligación direccional de pBlueCMV (Invitrogen, USA) con el fragmento IκBα S32/36A (HindIII/XbaI) obtenido a partir de la construcción pFlag IκBα DN (Sigma, USA). Para construir el plásmido pBacCMV Wt, se ligó de forma direccional el fragmento IκBα Wt (HindIII/EcoRI) de pFlag IκBα Wt con pBlueCMV. El plásmido pBacCMV-GFP, fue generado en el laboratorio del Dr. Luis Vaca, IFC-UNAM a través de la ligación del gen de la proteína verde fluorescente *gfp*, con extremos BamHI/NotI del plásmido pEGFP-N1 (Clontech, USA), en los sitios KpnI y ApaI de pBlueCMV. Las ligaciones se hicieron con la enzima T4 DNA ligasa (Promega, USA). Los plásmidos fueron purificados con kits de maxi o mini preparaciones comerciales (QIAGEN, USA) y fueron sometidos a análisis de restricción, PCR y secuenciación (Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica UNAM-INNSZ) para corroborar su identidad.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar el fragmento de IκBα Wt y DN S32/36A (352 pb), a partir de pFlag IκBα Wt se diseñaron dos oligonucleótidos con el programa Oligo IV que optimiza los parámetros relevantes para la amplificación. Oligonucleótido sentido: 5'-gagcggctactggacgac-3' (+64). Oligonucleótido antisentido (+377) 5'-gctcccagaagtgcctca-3'. La PCR se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: 1) 95 °C 2 min; 2) 95 °C 1min; 3) 60 °C 1min; 4) 72 °C 7 min; 5) 4 °C ∞; el producto se amplificó con 35 ciclos. (GenAmp RNA PCR Core Kit, Roche/Applied Biosystems).

Transfección de HEK 293T

Las células HEK293T se sembraron en placas de 6 pozos (Corning, USA) a una densidad de 0.3125×10^5 células/cm² en medio DMEM suplementado y se incubaron toda la noche. Se cambió el medio por DMEM sin antibiótico y se incubaron por 3-4 h previas a la transfección. Posteriormente, las células fueron transfectadas con 5 µg de plásmido mediante la técnica de fosfato de calcio usando un kit comercial (Calcium phosphate transfection kit, Invitrogen, USA).

Producción de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes fueron generados mediante la recombinación homóloga del plásmido de transferencia pBacCMV-GFP y el ADN genómico viral de AcMNPV linearizado con Bsu36I (Invitrogen, USA); ambos fueron co-trasfectados mediante lípidos catiónicos. (CELLFECTINE ®, Invitrogen, USA) en células Sf9. Después de una semana de incubación se recuperó el sobrenadante y se realizaron diluciones de 10^{-3} - 10^{-8} en medio de cultivo fresco suplementado para realizar ensayos de placa de lisis en agarosa de bajo punto de fusión (Invitrogen, USA) al 3 % (Sigma, USA) con medio suplementado en proporción 1:1 y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal, Sigma, USA), para identificar las placas azules que expresaron *lacZ*. Después de dos rondas de purificación, 180 mL de células Sf9 a una densidad de 2×10^6 células/mL, fueron infectadas a 1 MOI (del inglés *multiplicity of infection*, número de partículas virales por célula) de baculovirus y se amplificaron durante 5-7 días a 27 °C y en agitación.

Transducción de células endoteliales

Las células endoteliales fueron sembradas en placas de 12 pozos a una densidad aproximada de 0.625×10^5 células/cm² en medio M199 suplementado; 48 h después, las células fueron lavadas 3 veces con medio Opti-MEM (Invitrogen, USA) sin suero y sin antibiótico e incubadas con baculovirus recombinantes a distintas MOI en 0.5 mL del mismo medio durante 4 h. Posteriormente el medio con virus fue removido y se agregó medio M199 suplementado solo o con Tricostatina A (TSA) 20-40 nM (Sigma, USA). Los ensayos se realizaron 48 o 96 h posteriores a la transducción (hpt).

Citometría de flujo

La identificación de células positivas para GFP (GFP+) y su intensidad media de fluorescencia (IMF) se llevó a cabo mediante citometría de flujo (FACS, Calibur, BD Biosciences) 48 hpt. Las células se despegaron con tripsina al 0.1 % (Sigma, USA) a 37 °C y se colectaron en tubos Falcon de 15 mL con medio M199. Las células se centrifugaron a 1500 x g por 5 min y se aspiró el sobrenadante. Se hicieron tres lavados con PBS para eliminar rastros de suero. Se incluyó un control de células no tratadas y células tratadas únicamente con TSA para normalizar el número de células GFP+ y la IMF. La adquisición y el análisis de los datos se hizo con el software CellQuest (BD Biosciences, USA).

Ensayo de adhesión

El ensayo de adhesión *in vitro*, fue desarrollado en nuestro laboratorio para medir la capacidad de las células endoteliales de establecer uniones firmes con las células pro monocíticas U937 (López Bojórquez *et al*, 2004 y Estrada *et al*, 2003). La prueba consiste en medir la radioactividad de las células U937 marcadas que permanecen adheridas al endotelio estimulado. Este ensayo funcional representa un excelente modelo para medir la activación de las células endoteliales en respuesta a distintos estímulos proinflamatorios como TNF α .

Se infectaron células endoteliales de acuerdo al protocolo antes descrito y 48 h después, las células infectadas y sus controles fueron despegadas y sembradas a una densidad de $7-10 \times 10^5$ células/cm² en placas de 48 pozos. A la par, 2×10^6 células U937 se marcaron radioactivamente con 1 μ Ci/mL de timidina tritiada con una actividad específica de 20 μ Ci/mmol (740 GBq/mmol) (Perkin Elmer, USA). Tanto las células endoteliales como las U937 se incubaron durante 48 h. El ensayo se inició al estimular ambos grupos de HUVECs con 10 ng/mL de TNF α en medio M199 suplementado durante 3 h. A las células control únicamente se les agregó medio fresco. Mientras tanto, las células U937 fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar los residuos de la timidina no incorporada y se resuspendieron en medio RPMI y M199 suplementados en proporción 1:1. Al término de la incubación con el estímulo con TNF α (control positivo) se retiró el medio de cultivo, se agregaron 2×10^5 células U937/cm² y se co-incubaron durante 2 h. Transcurrida la co-incubación, se removieron las células no adheridas

mediante 2 lavados con PBS $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ a 37 °C. Las células marcadas que permanecieron adheridas al endotelio, fueron lisadas con 500 μL de NaOH 0.2 M. Finalmente, los lisados se mezclaron con 3 mL de líquido de centelleo y las cuentas por minuto (cpm) se midieron en un contador de emisiones β (Packard).

Inmuno ensayos tipo Western blot

Para realizar estos experimentos, HUVECs a una densidad de 6.25×10^4 células/ cm^2 fueron sembradas en placas de 6 pozos y se siguió el protocolo de transducción mediada por baculovirus. Noventa y seis hpt, se estimularon con $\text{TNF}\alpha$ 10 ng/mL durante 6 h para evaluar la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E, (Esquivel Chirino, 2007). Para evaluar la degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en las células HEK 293T, 48 h posteriores a la transfección, se estimularon con $\text{TNF}\alpha$ 10 ng/mL durante 25 min.

Una vez finalizada la incubación con los estímulos, las células fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas con 150 μL de solución de lisis. Se recuperó el lisado y se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min a 4 °C; se separó el extracto proteico de los restos celulares y se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Se corrieron 10 μg de proteína total en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) a 80 V durante 3.5 h. Las proteínas ya separadas mediante la electroforesis, se electrotransfirieron a 35 V a una membrana de polivinil PVDF (BioRad) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos en la membrana con leche descremada en polvo (Sveltis) al 5% en TBS-Tween al 0.1% durante 1 h a

temperatura ambiente y en agitación suave. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS-Tween al 0.1% con albúmina (Roche, USA) al 1%: anti-ICAM-1 (1:1000), anti-V-CAM-1 (1:1000), anti-IkB α (1:1000), anti- β -actina (1:500), y anti-GFP (1:1000); anti-Selectina-E (1:1000) se diluyó en albúmina al 3%. Con estas diluciones, los anticuerpos primarios se incubaron con la membrana durante 2 h en agitación. Sólo el anticuerpo anti-GFP se incubó toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-Tween al 1 % y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 min. La señal de quimioluminiscencia se obtuvo al incubar las membranas con un reactivo comercial (SuperSignal West Pico Chemiluminescent, Thermo Scientific) por 5 min. Las bandas se visualizaron al revelar películas de autoradiografía (Kodak MXB).

RESULTADOS

Susceptibilidad de transducción mediada por baculovirus en células endoteliales

Con la finalidad de evaluar la susceptibilidad de transducción de los cultivos primarios de células endoteliales humanas primarias, se utilizó el baculovirus BacCMV-GFP (Figura 5A). Dicho virus contiene la secuencia del enhancer y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV-IE) (nucleótidos -655 a +106); este promotor es ubicuo y promueve niveles altos de expresión en células de orígenes diversos (Ramesh *et al.*, 1995). El promotor de CMV en este baculovirus recombinante, controla la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero.

Las HUVECs fueron infectadas con BacCMV-GFP (a MOI de 9,800), utilizando virus previamente purificados y concentrados por ultracentrifugación. Posteriormente las células fueron tratadas con el inhibidor de desacetilasas de histonas tricostatina A (TSA) a 20, 30 y 40 nM. El análisis del porcentaje de células GFP positivas (GFP+) y la intensidad media de fluorescencia (IMF) fueron evaluados 48 hpt mediante citometría de flujo. A este tiempo se ha observado la expresión máxima del gen reportero en distintas líneas celulares (Luz Madrigal *et al.*, 2008). Se observó que las células tratadas únicamente con baculovirus, alcanzaron un máximo de 17%, mientras que la fluorescencia basal de las células tratadas únicamente con TSA no aumentó (Figura 5B).

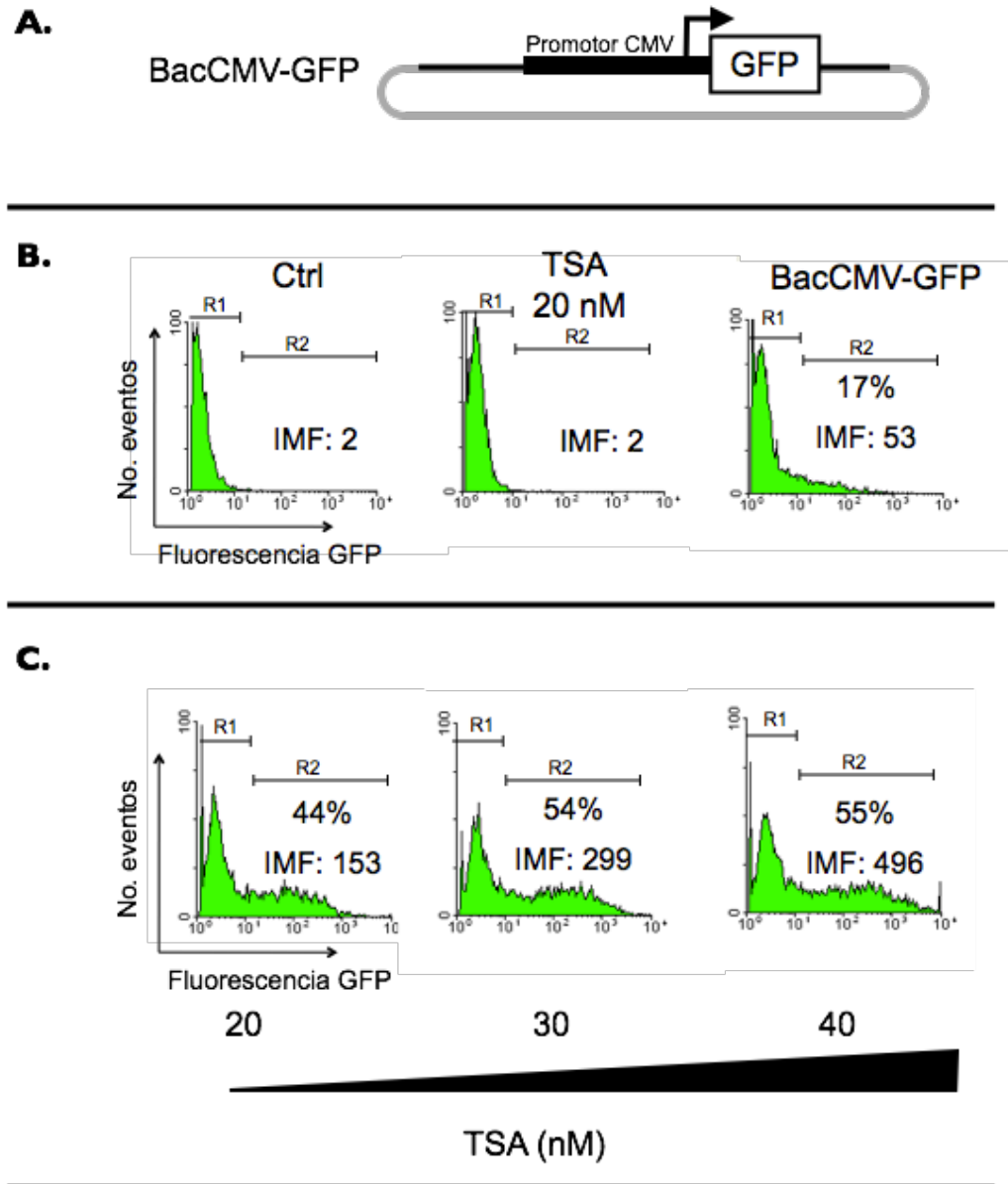


Figura 5. Susceptibilidad de transducción en células endoteliales primarias. A) Estructura del casete de expresión (en negro) del virus BacCMV-GFP. CMV, promotor/enhancer del citomegalovirus; GFP, proteína verde fluorescente. B) Histogramas obtenidos por citometría de flujo de HUVECs sin transducir y sin TSA (Ctrl), sólo con TSA 20 nM por 48 h (TSA) o con baculovirus (BacCMV-GFP) a 9,800 MOI después de 48 h. C) Histogramas obtenidas de HUVECs transducidas con baculovirus tratadas con concentraciones crecientes (20,30 y 40 nM) de TSA. Los números en los histogramas se refieren al porcentaje de células GFP⁺; IMF: intensidad media de fluorescencia. Se muestra el porcentaje de células GFP⁺ localizadas dentro de la región R2.

La adición de TSA inmediatamente después de la transducción, produjo un aumento directamente proporcional a la concentración del inhibidor en la cantidad de las células GFP+ que alcanzó un máximo de 54 y 55% con 30 y 40 nM de TSA, respectivamente. Cabe mencionar que la IMF se duplicó con la mayor concentración de TSA (Figura 6C). Con 40 nM de TSA se alcanzaron niveles de fluorescencia de 10^4 . Ya que se ha reportado que la GFP en altas concentraciones puede ser citotóxica (Stepanenko *et al.*, 2008), para los experimentos posteriores, se decidió usar la concentración de 30 nM del inhibidor que dio una IMF que apenas alcanza 10^4 . El número de células GFP+ obtenidas fue suficiente para continuar evaluando la respuesta de las células endoteliales a baculovirus.

Evaluación de la respuesta de las células endoteliales a baculovirus modificados mediante un ensayo funcional de adhesión

Una vez establecidas las condiciones óptimas de transducción, el siguiente objetivo fue determinar si la infección con baculovirus era capaz de activar al endotelio. Como una medida de activación endotelial utilizamos el ensayo funcional de adhesión *in vitro* desarrollado en nuestro laboratorio (López Borjorquez *et al.*, 2004).

La evaluación de la adhesión de las células de mieloma U937 a la monocapa de células endoteliales se llevó a cabo en diversas condiciones: sin estimular (Ctrl), transducidos con baculovirus BacCMV-GFP más el inhibidor TSA y con TSA únicamente. Estos grupos a su vez se dividieron y se estimularon o no con TNF α 10 ng/mL para incrementar la adhesión basal y evaluar la capacidad de

respuesta de las células. Las células U937 se marcaron con ^3H , por lo que la adhesión se evaluó por medio de las cuentas por minuto obtenidas normalizadas al total de células sembradas (2×10^5 células/pozo).

Se observó que los baculovirus no indujeron un incremento en la adhesión basal, pero redujo la adhesión promovida por $\text{TNF}\alpha$ en un 30%. La TSA no alteró la adhesión basal, pero redujo la adhesión inducida por $\text{TNF}\alpha$ (Figura 6).

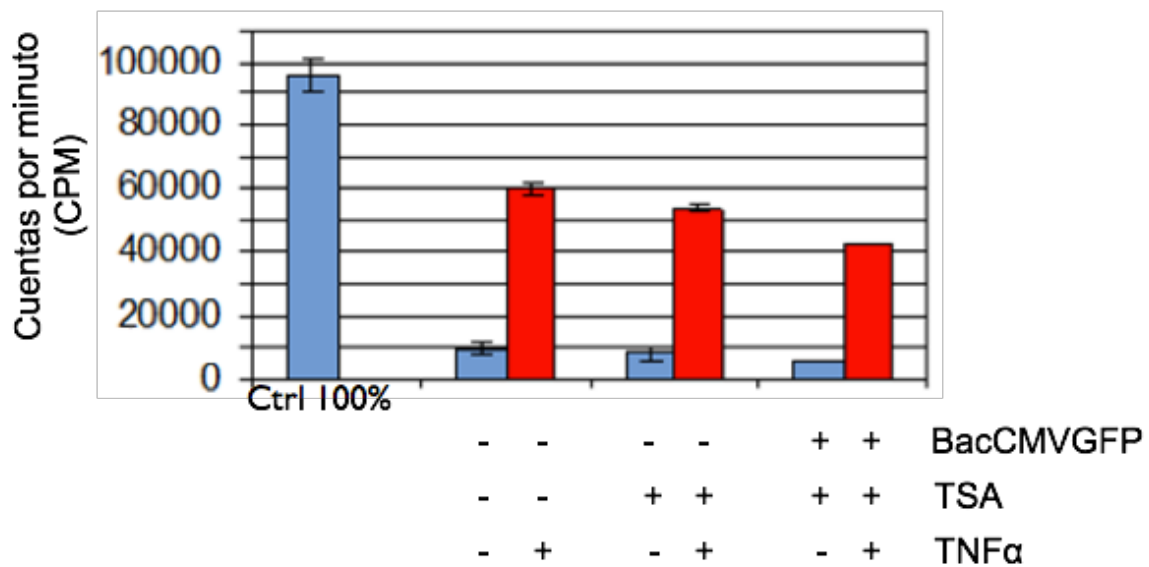


Figura 6. Ensayo de adhesión de células U937 (^3H) a células endoteliales infectadas con baculovirus.

Análisis de la expresión de moléculas de adhesión selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1, en células endoteliales humanas tratadas con TNF α

Con el objetivo de continuar con la caracterización del efecto de la transducción mediada por baculovirus recombinantes en la activación del endotelio, se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión endotelial selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 que empleamos como marcadores moleculares del estado endotelial activado (Collins *et al.*, 1995). La detección se realizó por medio de inmunoensayos tipo Western blot en extractos totales de HUVECs (96 hpt) tratadas con TNF α durante 6 horas.

Se observó que en las células infectadas con baculovirus, no hubo expresión ni de selectina-E ni de VCAM-1. Ambos marcadores aparecieron sólo después de estimular las células con TNF α , por lo que a pesar de haber sido transducidas con los virus recombinantes, las HUVECs mantuvieron su capacidad de respuesta a estímulos activadores. Sin embargo, ICAM-1, que en condiciones basales ya se expresa en mínimas cantidades, incrementó su expresión en las células transducidas con el virus. A pesar de este aumento, el tratamiento con TNF α incrementó la señal de ICAM-1 tres veces más, a un nivel indistinguible del que indujo TNF α en células no transducidas. Por otro lado las células tratadas únicamente con tricostatina A, al igual que las control, expresaron los marcadores únicamente en respuesta a TNF α . En las células transducidas con BacCMV-GFP, se comprobó el éxito de la transducción, al detectar la expresión de la proteína

verde fluorescente como reportero. Se utilizó el gen de β -actina como control de cargado. (Figura 7).

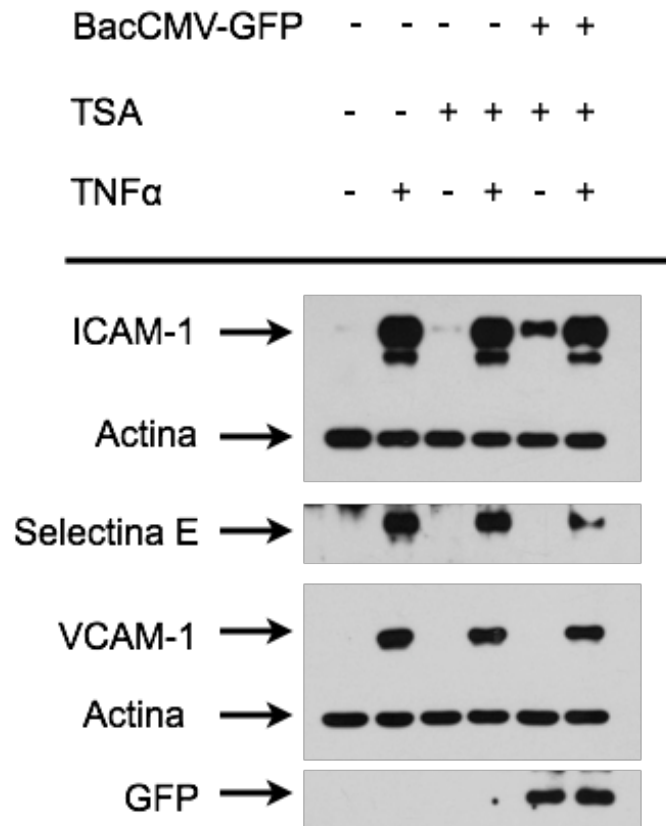


Figura 7. Inmunoanálisis tipo Western blot de moléculas de adhesión de células endoteliales transducidas con baculovirus recombinantes. HUVECs infectadas con baculovirus y 96 h después tratadas con TNF α (10ng/ml) durante 6h. 10 μ g de proteína/carril.

Análisis de la degradación de I κ B α en células endoteliales humanas transducidas con baculovirus

Para determinar la participación de la vía clásica de NF- κ B en la expresión de ICAM-1 en células transducidas con baculovirus, se evaluó la degradación del inhibidor I κ B α . La detección se realizó por medio de inmunoensayos tipo Western blot en extractos totales de HUVECs (96 hpt) tratadas con TNF α durante 25 min.

Se observó que en las células transducidas con baculovirus, no hubo degradación de I κ B α , pero al agregar TNF α como control positivo, el inhibidor sí se degradó. Este comportamiento fue similar al control en las dos condiciones (Figura 8).

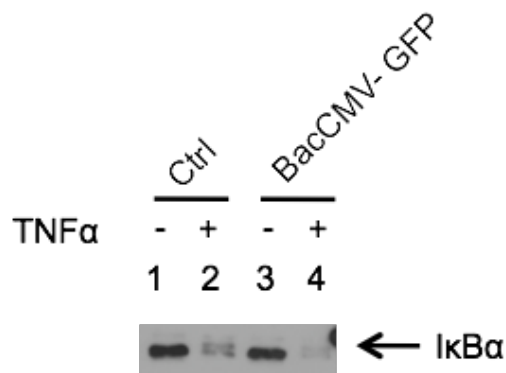


Figura 8. Inmunoanálisis tipo Western blot de I κ B α en células endoteliales transducidas con baculovirus recombinantes. HUVECs infectadas con baculovirus y 96 h después tratadas con TNF α (10ng/ml) durante 25 min. 10 μ g de proteína/carril.

Construcción de un vector recombinante baculoviral para la expresión transitoria de I κ B α S32/36A en células de mamífero

El siguiente objetivo fue construir un vector de expresión con un casete BacMam con la forma dominante negativa del cADN de I κ B α S32/36A (DN) marcado con el epítotope Flag y bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Esto con la finalidad de generar transfectantes transitorias cuya vía clásica de activación de NF- κ B sea inhibida al sobre expresar formas de I κ B α que no pueden ser fosforiladas y por lo tanto, no pueden ser degradadas. A la par se construyó un vector con las mismas características, pero con la forma silvestre de I κ B α (Wt), que serviría como control.

Primero se construyeron los plásmidos de transferencia mediante ligaciones direccionales de fragmentos HindIII/XbaI y HindIII/EcoRI (Ver Material y métodos). Estos plásmidos contienen los casetes BacMam con los sitios que recombinan con el ADN genómico del virus.

Para comprobar la identidad de cada uno de los plásmidos, se linearizaron con la enzima HindIII. De acuerdo a lo esperado, las clonas de pBac I κ B α DN y pBac I κ B α Wt mostraron un peso molecular mayor (~8 kpb), correspondiente a la suma del inserto (1.2 kpb) más el vector destino (6.9 kpb) (Figura 9A). Posteriormente, se liberó el inserto de ambos plásmidos mediante digestiones dobles con HindIII/XbaI y HindIII/EcoRI para el plásmido DN y Wt, respectivamente. El peso molecular en ambos casos correspondió al del inserto liberado del plásmido de origen pFlag I κ B α Wt (1.2 kpb) (Figura 9B). La identidad

del inserto se confirmó mediante la amplificación por PCR del fragmento del cDNA ligado que fue positiva en ambas clonas, generando el fragmento esperado de 352 pb (Figura 9C).

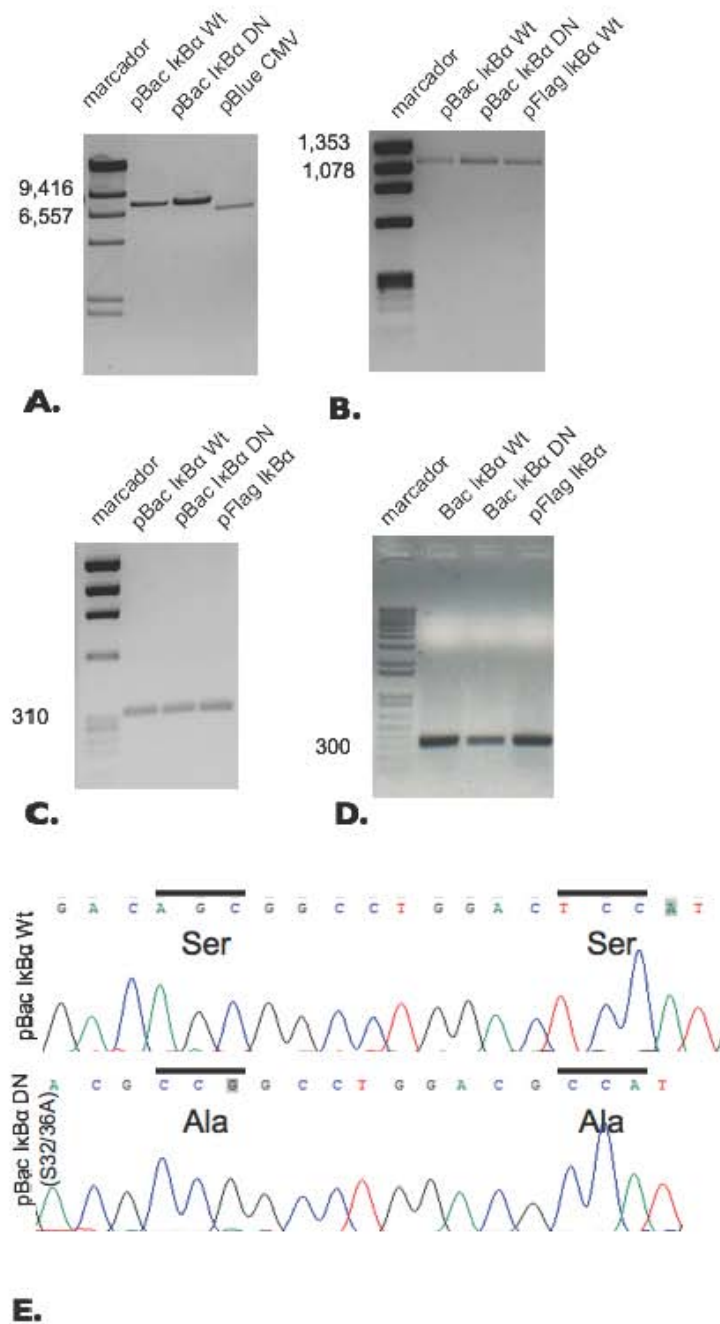


Figura 9. Construcción de baculovirus recombinantes

Para obtener los baculovirus recombinantes se siguió el protocolo antes descrito (Material y métodos) y con el fin de monitorear el éxito de la recombinación, se adicionó X-gal al sobrenadante de los virus y se observó su cambio a color azul. También se amplificó mediante PCR el mismo fragmento de IκBα que se probó con los plásmidos de transferencia, pero ahora partiendo del ADN genómico purificado de los virus recombinantes obtenidos. Tanto el baculovirus IκBα DN como el Wt, amplificaron el fragmento de 352 pb (Figura 9D).

Finalmente, para comprobar que durante la manipulación no se alteró la secuencia de IκBα y que en efecto, las mutaciones puntuales correspondían a S32/36A, ambas construcciones fueron secuenciadas en la Unidad de Medicina Genómica y Biología Molecular UNAM-INNSZ. Se observó que la construcción Wt, mantuvo los codones correspondientes a las Ser32/36, mientras que en la DN se encontraron los que codifican para Ala32/36 (Figura 9E).

Análisis de la expresión de I κ B α en células HEK 293T transfectadas con vectores derivados de baculovirus

Con la finalidad de corroborar que los vectores derivados de baculovirus que generamos (Figura 10A) eran capaces de producir proteínas recombinantes I κ B α DN y Wt funcionales. La sobre expresión de I κ B α DN debiera resultar en formas del inhibidor que no se degradan en células estimuladas con TNF α . Para este fin, se transfectaron las células HEK 293T con pBacCMV-GFP, pBac I κ B α DN y Wt y se evaluó la degradación de I κ B α por medio de inmunoensayos tipo western blot de extractos totales de las células transfectadas tratadas con TNF α durante 25 min.

Se observó que en las células transfectadas con pBacCMV-GFP, la expresión de I κ B α fue similar a los niveles observados en las células controles, en las que, al recibir el estímulo con TNF α , I κ B α se degradó como se esperaba. Por otro lado, se encontró una sobre expresión del inhibidor en las células transfectadas con pBac I κ B α DN y Wt. Ambos grupos fueron estimulados con TNF α y encontramos que, mientras que la expresión de la forma DN de I κ B α se mantuvo constante, en la condición pBac I κ B α Wt se degradó sólo la proteína endógena. Se identificó la forma exógena de I κ B α de mayor peso molecular gracias a su marca con el epítoto Flag. Se utilizó el gen de β -actina como control de cargado (Figura 10B). Las células transfectadas con pBacCMV-GFP fueron analizadas por citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células GFP+ como un indicador de la eficiencia de transfección. Se alcanzó un porcentaje de células GFP+ >80 % (Figura 10C).

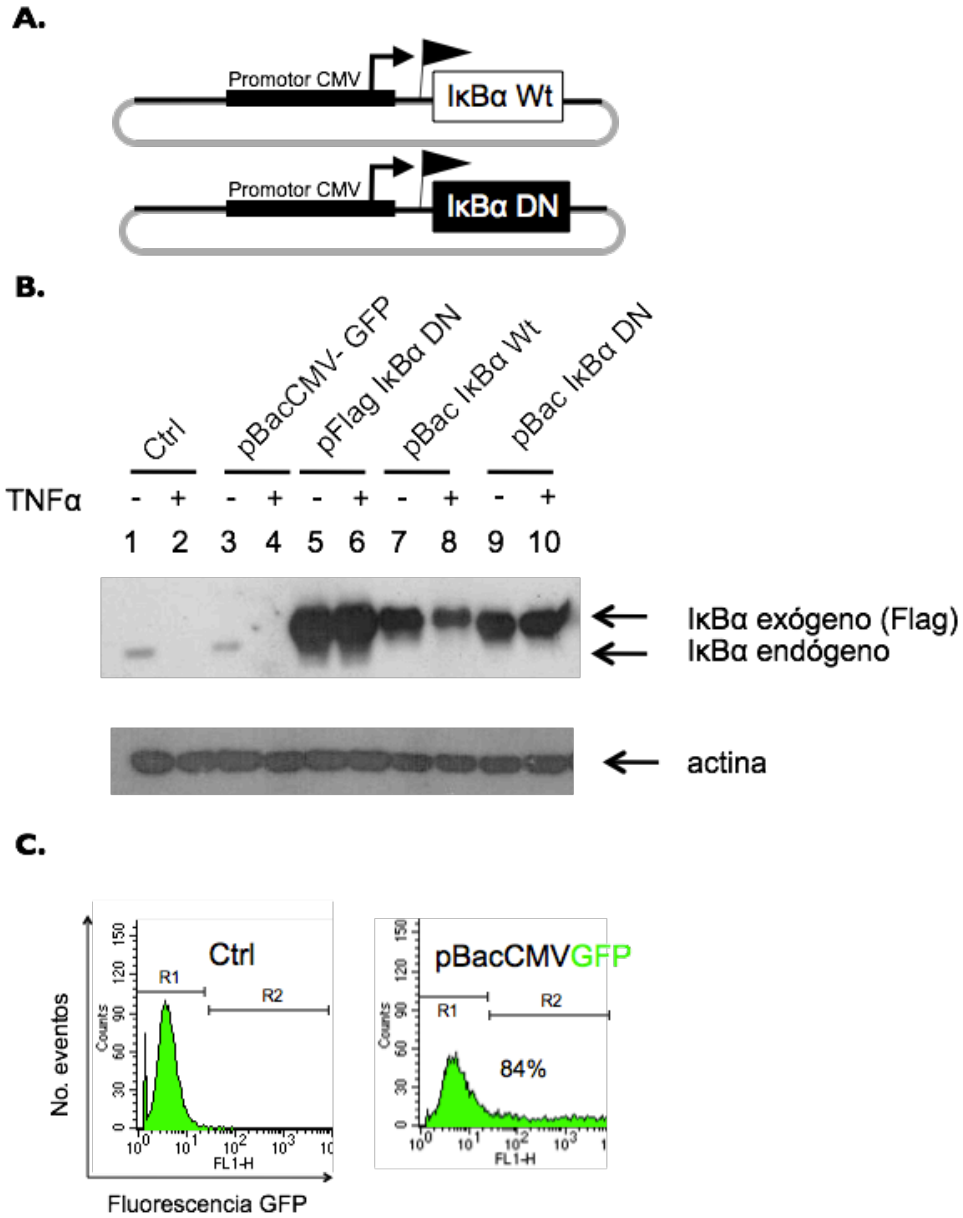


Figura 10. Análisis de la expresión de IκBα en células HEK 293T transfectadas con vectores derivados de baculovirus A) Estructura del casete de expresión dentro de los plásmidos pBac IκBα DN y pBac IκBα Wt. CMV, promotor/enhancer del citomegalovirus. B) Inmunoanálisis tipo western blot de las formas exógenas y endógenas de IκBα en células HEK293T transfectadas con 2.5 μg de plásmidos baculovirales y 48 h después tratadas con TNFα (10 ng/mL) durante 25 min. 10 μg de proteína/carril. La forma exógeno contiene el epítipo de identificación Flag. C) Histogramas obtenidos por citometría de flujo de las células transfectadas con pBac CMV-GFP. Se muestra el porcentaje de células GFP+ localizadas dentro de la región R2.

DISCUSIÓN

Los baculovirus recombinantes han demostrado ser una alternativa poderosa para la introducción de material genético en una amplia variedad de células de mamífero (Kost *et al*, 2005). Ya que empleando otros sistemas de expresión la eficiencia de transducción de células endoteliales primarias ha sido deficiente, en este trabajo de investigación, evaluamos la capacidad de los baculovirus modificados para introducir material genético y expresar transgenes (GFP, IκBα DN y Wt) en células endoteliales primarias obtenidas del cordón umbilical humano (HUVECs). Estudios previos reportaron que la línea celular endotelial de carcinoma ECV-304 fue prácticamente incapaz de ser transducida por baculovirus recombinantes (Airenne *et al*, 2000). Sin embargo, Luz-Madrigal y colaboradores demostraron lo contrario en la línea celular de endotelio obtenido de la vena de cordón umbilical bovino (BUVEC) y en el endotelio vascular de retina de rata (*in vivo*) (Luz-Madrigal *et al*, 2007). Estos resultados fueron los antecedente directos de este trabajo.

Uno de los mecanismos de regulación de la expresión genética, es la modificación post traduccional de las histonas (Strahl y Allis, 2000). La acetilación y desacetilación de las histonas se correlacionan con la activación y represión de la expresión de genes respectivamente (Zhang y Reinberg, 2001). En los primeros reportes del uso de baculovirus como vectores de expresión en mamífero, se encontró que en algunas líneas celulares no había expresión de los genes reporteros, pero sí contenían partículas virales en su citoplasma y núcleo. (Boyce

et al, 1996 y Hoffman *et al*, 1995). Estudios posteriores sugirieron que la falta de expresión de los reporteros podía deberse a mecanismos de represión epigenética. En respuesta a esta hipótesis, se describió que la adición de inhibidores de la desacetilación como el butirato de sodio y la tricostatina A (TSA), promovía la expresión del reportero en células que parecían no ser susceptibles a baculovirus modificados,(Luz-Madrigal *et al*, 2007). Nuestros resultados confirman los reportados, pues al agregar TSA, se activó la expresión de la proteína verde fluorescente en los cultivos primarios de células endoteliales. La concentración a la cual usamos la TSA (30 nM), fue similar a la que se ha usado en otros sistemas. Considerando que el ADN del baculovirus es incapaz de integrarse al genoma de las células de mamífero y se mantiene en forma episómica (Tija *et al*, 1983), la represión parece estar mediada por acetilación de proteínas, ya que el TSA es un inhibidor específico de desacetilasas de proteínas, a diferencia del butirato de sodio que también inhibe a las desacetilasas metabólicas (Yoshida y Horinouchi, 1999). Ya que el estado transcripcional de la cromatina se asocia con histonas acetiladas, el efecto de TSA sobre la expresión baculoviral, se ha explicado como un mantenimiento de histonas acetiladas y por lo tanto de una cromatina viral transcripcionalmente activa. Sin embargo, también se ha postulado que la represión de la expresión se debe a proteínas virales similares a histonas que también pueden sufrir modificaciones post traduccionales (cita). La dependencia de acetilación en la expresión de baculovirus, sugiere la existencia de un mecanismo celular de defensa antiviral. Por lo anterior, el uso de TSA en otros sistemas de expresión viral episómicos como los basados en adenovirus,

podría resultar en una mayor expresión del transgen. Esta idea se refuerza con los reportes en donde hepatocitos infectados con baculovirus recombinantes aumentan su eficiencia transcripcional en presencia de TSA (Luz-Madrigal *et al*, 2007). Existen 14 desacetilasas de histonas y el TSA inhibe a 10 de ellas, por lo tanto, es importante considerar el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban específicamente a las desacetilasas relevantes para mantener la actividad transcripcional de baculovirus recombinantes.

Para evitar el uso de los inhibidores de desacetilasas y contar con células transducidas estables, se han realizado modificaciones adicionales a los baculovirus que permiten su integración al genoma celular (Zeng *et al*, 2007). Esta estrategia no es práctica para cultivos primarios, como es el caso de las células endoteliales en nuestro estudio, debido a que después de 10 divisiones celulares (equivalentes a 4 pasajes de cultivo) comienzan a aparecer células senescentes.

Mediante un ensayo funcional de adhesión desarrollado en nuestro laboratorio (López-Bojórquez *et al*, 2004), encontramos que los baculovirus no activan al endotelio. Este resultado es significativo si se compara con el efecto de la infección con sistemas retro y adenovirales. En el primer caso, construcciones semejantes a la de este trabajo, indujeron un fenotipo endotelial proadhesivo en ausencia de estímulos como TNF α (datos no publicados de Pérez Bécker y Jaidar). En el segundo caso, los adenovirus también activaron el endotelio (Rafii *et al*, 2002). Estos resultados sugieren una inmunidad pre existente a virus de mamífero. En contraste con estos sistemas virales, las HUVECs transducidas con baculovirus mantuvieron su capacidad de respuesta a TNF α , aunque en menor

grado que las células control. Es interesante notar que, si bien el TNF α es el estímulo clásico para inducir activación endotelial, la transducción con baculovirus disminuyó la respuesta a TNF α . Esta disminución podría deberse a una interferencia con la activación primaria del sistema NF- κ B o con otras vías independientes necesarias para la adquisición de un fenotipo endotelial proadhesivo. Un resultado preliminar que analiza la degradación de I κ B α en HUVECs transducidas con baculovirus recombinantes, no muestra efecto sobre la señalización de NF- κ B α . Esto sugiere que el virus afecta otras vías que contribuyen al fenotipo endotelial adhesivo.

La activación implica un cambio dramático de funciones en las células endoteliales, y por lo tanto, un cambio en la expresión de un gran número de genes. Para analizar estos fenómenos, se han hecho estudios de microarreglos de ADN en modelos de inflamación *in vitro* como el nuestro (Mayer *et al*, 2004 y García-Conesa *et al*, 2009). Por ejemplo, en HUVECs estimuladas con citocinas proinflamatorias como IL-1 β , más de 2,500 genes fueron expresados diferencialmente (Williams *et al*, 2008). Entre estos genes, se encuentran ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E, mediadores de la adhesión de los leucocitos a las CE (Springer, 1995) y considerados como marcadores clásicos de la activación endotelial (Garlanda *et al*, 1996). De la gama de genes que se expresan durante la activación, decidimos evaluar si los baculovirus recombinantes modificaban la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E, ya que estas moléculas de adhesión juegan un papel tan importante que, al inhibir su función mediante anticuerpos monoclonales, la adhesión de leucocitos a las CE se inhibe (Williams *et al*, 2008 y

Sermathanasawadi *et al*, 2009). Al analizar estos marcadores, encontramos que los baculovirus no indujeron la expresión de selectina-E ni de VCAM-1, pero sí la de ICAM-1. Sin embargo, la expresión de ICAM-1 producida por baculovirus, se incrementó tres veces más con el tratamiento con TNF α y su nivel de expresión alcanzó una señal indistinguible de la que indujo TNF α en células no transducidas. Para nuestro grupo, el mantener CE transducidas pero en su estado basal es una meta importante, que permitirá estudiar los eventos moleculares que controlan la activación endotelial. Desde ese punto de vista, el hecho de que sólo uno de los tres marcadores de activación se haya expresado en respuesta a los baculovirus recombinantes, sugiere una activación endotelial parcial. Si bien esto sugiere una limitante para estudiar estos mecanismos, el que el TNF α pueda activar a los otros dos marcadores moleculares y que ICAM-1 pueda responder alcanzando su nivel máximo de expresión, deja espacio para analizar los procesos moleculares de activación de los otros dos marcadores. Que se expresara únicamente ICAM-1 fue inesperado, ya que los promotores de los tres marcadores evaluados contienen elementos de respuesta para NF- κ B (ERs κ B) y por lo tanto, su expresión depende de este factor transcripcional (Collins *et al*, 1995 y Muller *et al*, 1992). ICAM-1 tiene un solo ER κ B, VCAM-1 tiene dos y selectina-E tiene tres. En respuesta a TNF, la activación de estos tres promotores es totalmente dependiente de NF- κ B y su expresión en el tiempo correlaciona con el número de ERs κ B presentes en el promotor (Estrada-Bernal, 1998). Esta tesis no es el primer reporte en que se describe la expresión de sólo uno de los tres marcadores de activación. En un modelo similar al nuestro, pero empleando adenovirus, se reportó que este virus

incrementó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 pero no la de selectina-E (Williams *et al*, 2008). Los resultados anteriores y los presentados en este trabajo sugieren que, pese a que los tres marcadores de adhesión están controlados por NF- κ B, su expresión diferencial puede ocurrir debido a la activación de vías de señalización independientes de la vía clásica de NF- κ B como AP-1 (Lawson *et al*, 2009).

Una meta que no se pudo alcanzar en este trabajo, fue la aplicación de los baculovirus recombinantes con las formas DN y Wt de I κ B α como herramientas para interferir con activación de la vía clásica de NF- κ B en respuesta a citocinas proinflamatorias como TNF α . Nuestro grupo de trabajo ha encontrado que la mezcla de factores solubles de células con alto potencial metastático, es capaz de inducir un fenotipo adhesivo en las HUVECs (Montes *et al*, 2010). Por tal motivo, los baculovirus que generamos en este trabajo, serán útiles también para determinar si en esta activación endotelial inducida por factores solubles de células tumorales metastásicas, la vía clásica del sistema NF- κ B participa.

En resumen, este trabajo constituye el primer reporte del uso de baculovirus recombinantes como vectores de expresión en HUVECs y su efecto sobre su estado basal. Nuestros resultados sugieren el uso de baculovirus como una alternativa eficiente y segura para la expresión de proteínas recombinantes que permitan estudiar la fisiología endotelial.

CONCLUSIONES

Se realizó una caracterización parcial del fenotipo proadhesivo de las células endoteliales transducidas con baculovirus recombinantes:

- Las células endoteliales fueron susceptibles a la transducción mediada por baculovirus.
- Los marcadores de activación endotelial VCAM-1 y selectina-E no son modificados por el virus y sólo ICAM-1 se expresó en respuesta a baculovirus.
- Los baculovirus modificados no promovieron un fenotipo endotelial proadhesivo.
- Las HUVECs mantienen su capacidad de respuesta a estímulos activadores como TNF α luego de ser transducidas con baculovirus.

Se construyó un baculovirus recombinante capaz de inhibir la vía clásica de NF- κ B con un casete de expresión controlado por el promotor de citomegalovirus (CMV) y marcado con el epítotope Flag para ser identificado.

PERSPECTIVAS

Los baculovirus han demostrado tener un gran potencial en la investigación básica. Sin embargo, el uso de baculovirus como vectores de expresión en células de mamífero se encuentra aún en las etapas tempranas de su desarrollo. El endotelio vascular es un importante blanco de estudio, pues la alteración de su fisiología está relacionada con un gran número de enfermedades. Los baculovirus se presentan como una excelente alternativa para estudiar estos fines. Sin embargo, es necesario continuar con la caracterización de la respuesta del endotelio a baculovirus, pues existen escasos reportes al respecto. En esta tesis nos concentramos en los mecanismos de activación endotelial, pero mediante baculovirus recombinantes, podremos expresar virtualmente cualquier transgen para estudiar la activación endotelial u otros mecanismos celulares.

BIBLIOGRAFÍA

Ackermann H-W, Smirnoff WA. (1983) A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J Invertebr Pathol* 41: 269–280

Adams, JR & McClintock JT. (1991) Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. In Atlas of Invertebrate Viruses, pp. 87-204. Edited by J. R. Adams & J. R. Bonami. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Ahn SK, Choe TB, Kwon TJ. (2003) The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide using cDNA microarray analysis. *Int J Mol Med.* 12(2):231-6.

Aird WC. (2007) Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ. Res.* 100;158-173.

Airenne KJ, Hiltunen MO, Turunen MP, Turunen AM, Laitinen OH, Kulomaa MS, Ylä-Herttuala S. (2000) Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* 7(17):1499-504.

Alexandre TM, Ribeiro ZM, Craveiro SR, Cunha F, Fonseca IC, Moscardi F, Castro ME. (2010) Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. *J Invertebr Pathol.* [Epub ahead of print]

Andersson M, Warolén M, Nilsson J, Selander M, Sterky C, Bergdahl K, Sörving C, James SR, Doverskog M. (2007) Baculovirus mediated gene transfer and recombinant protein expression do not interfere with insulin dependent phosphorylation of PKB/Akt in human cells. *BMC Cell Biol.* 19;8:6.

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays.* 16:901-906.

Avouac J, Uzan G, Kahan A, Boileau C, Allanore Y. (2008) Endothelial progenitors cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine* 75(2):131-7

Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 1;202(2):586-605

Baeuerle PA, Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 87(1):13-20).

Blissard GW. (1996) Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechnology.* 20(1-3): 73-93

Pérez Bécker R y Jaidar O (2004) Generación retrovirus recombinantes para el estudio de la activación de células endoteliales humanas primarias. Reporte rotación anual LIIB y Rotación anual NUCE Fac. Medicina-UNAM.

Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to

complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243(4895):1160-5.

Blissard GW, Rohrmann GF. (1990) Baculovirus diversity and molecular biology.. *Annu Rev Entomol.* 35:127-55. Review.

Boyce FM, Bucher NL. (1996) Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 19;93(6):2348-52.)

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (eds) (1995) *Virus Taxonomy – The Classification and Nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer- Verlag, NewYork

Bowen GP, Borgland SL, Lam M, Libermann TA, Wong NC, Maruve DA .(2002) Adenovirus vector induced inflammation: Capsid-dependent induction of the C-C chemokine RANTES requires NF κ -B. *Hum. Gene Ther.* 13, 367–379.

Brown MA, Jones WK. (2004) NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci.* 9:1201-17. Review.

Caamaño J, Hunter CA. (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev.*15(3): 414-29. Review.

Carbonell LF, Klowden MJ, Miller LK. (1985) Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J Virol.* 56(1):153-60.

Clapp C, Thebault S, Arnold E, García C, Rivera JC, de la Escalera GM. (2008) Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(4):E772-8.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9(10):899-909. Review.

Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. (1999) Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(1):127-32.

Cook-Mills JM, Deem TL. (2005) Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol.* 77(4):487-95.

Cotran RS, Pober JS. (1990) Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. *J Am Soc Nephrol.* 1(3):225-35. Review.

Couch JA. (1974) An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J Invertebr Pathol* 24: 311–331

Dhaouadi T, Sfar I, Abelmoula L, Jendoubi-Ayed S, Aouadi H, Ben Abdellah T, Ayed K, Zouari R, Gorgi Y. (2007) Role of immune system, apoptosis and angiogenesis in pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint destruction, a systematic review. *Tunis Med.* 85(12):991-8.

Dauphinee SM, Karsan A. (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86(1):9-22. Review

Dhaouadi T, Sfar I, Abelmoula L, Jendoubi-Ayed S, Aouadi H, Ben Abdellah T, Ayed K, Zouari R, Gorgi Y. (2007) Role of immune system, apoptosis and angiogenesis in pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint destruction, a systematic review. *Tunis Med* 85(12):991-8.

Dittmar T, Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Zänker KS. (2008) Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner. *Clin Exp Metastasis*. 25 (1):11-32.

Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, Luis de la Pompa J, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B, Muller WA, Senaldi G, Zukowski MM, Mak TW. (1999) Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol*. 162 (5):3022-30.

Esquivel Chirino C. (2007) Análisis del efecto de INF gamma sobre la activación de NFkB en células endoteliales humanas tratadas con TNFa. Tesis de maestría del programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud. Facultad de Odontología, UNAM.

Estrada-Bernal A, Mendoza-Milla C, Ventura-Gallegos JL, López-Bojórquez LN, Miranda-Peralta E, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Sánchez-Sánchez L, Zentella-Dehesa A. (2003) NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Lett*. 191(2):239-48

Estrada-Bernal A (1998) Efecto de TNFa en la expresión de moléculas de adhesión en cultivos primarios de células endoteliales. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Bióloga, Facultad de Ciencias-UNAM.

Finger EB, Puri KD, Alon R, Lawrence MB, von Andrian UH, Springer TA. (1996) Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature*. 379(6562):266-9

García-Conesa MT, Tribolo S, Guyot S, Tomás-Barberán FA, Kroon PA. (2009) Oligomeric procyanidins inhibit cell migration and modulate the expression of migration and proliferation associated genes in human umbilical vascular endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 53(2):266-76.

Goldberg RB. (2009) Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 94(9):3171-82

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998) F-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16:225-60.

Granados, R. (1994) A new cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 260-266

Goldberg RB. (2009) Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(9):3171-82

Hartig PC, Cardon MC, Kawanishi CY. (1992) Effect of baculovirus on selected vertebrate cells. *Dev Biol Stand.* 76:313-7

Ho YC, Chung YC, Hwang SM, Wang KC, Hu YC. (2005) Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *J Gene Med.* 7(7):860-8

Hofmann C, Sanding V, Jennings V, Rudolph M, Schlag P, Strauss M. (1995) Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 10099-10103

Hsu CS, Ho YC, Wang KC, Hu YC. (2004) Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 88(1):42-51

ICTVdB Management (2006). 00.006. Baculoviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

Ihalainen TO, Laakkonen JP, Paloheimo O, Ylä-Herttuala S, Airene KJ, Vihinen-Ranta M. (2009) Morphological characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.* 148(1-2):71-4.

Jarvis DL. (2003) Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology* 25;310(1):1-7. Review

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol.* 151(7):1257-66. Review

Kenoutis C, Efrose RC, Swevers L, Lavdas AA, Gaitanou M, Matsas R, Iatrou K. (2006) Baculovirus-mediated gene delivery into Mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression. *J Virol.* 80(8):4135-46.

Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. (1990) Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.* 11;18(19):5667-72.

Klein CL, Bittinger F, Skarke CC, Wagner M, Köhler H, Walgenbach S,

Kirkpatrick CJ. (1995) Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology*. 63(4): 204-12

Kool M, Ahrens CH, Vlak JM, Rohrmann GF. (1995) Replication of baculovirus DNA. *J Gen Virol*. 76 (Pt 9):2103-18. Review

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 23(5):567-75

Kost TA, Condreay JP, Ames RS, Rees S, Romanos MA. (2007) Implementation of BacMam virus gene delivery technology in a drug discovery setting. *Drug Discov Today*.12(9-10):396-403.

Lackner A, Genta K, Koppensteiner H, Herbecsek I, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Grusch M. (2008) A bicistronic baculovirus vector for transient and stable protein expression in mammalian cells. *Anal Biochem*. 1;380(1): 146-8

Lawson C, Wolf S. (2009) ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 61(1):22-32. Review

Lee DF, Chen CC, Hsu TA, Juang JL. (2000) A baculovirus superinfection system: efficient vehicle for gene transfer into *Drosophila* S2 cells. *J Virol*. 74(24):11873-80

Lee HP, Chen YL, Shen HC, Lo WH, Hu YC. (2007) Baculovirus transduction of rat articular chondrocytes: roles of cell cycle. *J Gene Med*. 9(1):33-43.

Ley K. (2002) Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev*. 186:8-18. Review

Liang CY, Wang HZ, Li TX, Hu ZH, Chen XW. (2004) High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. *Arch Virol*. 149(1): 51-60.

López-Bojórquez LN, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Montes-Sánchez D, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa (2004) NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta. *Inflamm Res*. 53(10):567-75.

Lopez-Bojorquez LN. (2004) Papel de las isoformas de la proteína inhibidora IKBa en la activación del factor de transcripción NF-kb. *REB* 23 (4): 140-148

Lorna MD, Hirst M, Ferber ML, Merryweather AT, Cayley PJ & Possee RD. (1991) Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* 352, 85 - 88

Lu H, Ouyang W, Huang C. (2006) Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res*. 4(4):221-33. Review.

Luckow VL & Summers MD. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6, 47-55

- Luque T, O'Reilly L.** (1999) Generation of baculovirus expression vectors. *Molecular Biotechnology* 13:153-164
- Luz-Madrigal A, Clapp C, Aranda J, Vaca L.** (2007) In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter. *Virology Journal* 18;4:88.
- Ma L, Tamarina N, Wang Y, Kuznetsov A, Patel N, Kending C, Hering BJ, Philipson LH.** (2000) Baculovirus-mediated gene transfer into pancreatic islet cells. *Diabetes*. 49(12):1986-91.
- Maeda S.** (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu Rev Entomol*. 34:351-72. Review
- Mantovani A, Garlanda C.** (2002) Endothelial cells: immunological aspects. *Encyclopedia of life sciences*.
- Mantovani A, Bussolino F, Introna M.** (1997) Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today*. 18(5):231-40. Review
- Mantovani A, Bussolino F, Dejana E.** (1992) Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 6(8):2591-9. Review.
- Maniloff J, Desselberger U,** Ball LA (eds) Virus Taxonomy – Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, NewYork, pp 1129–1185
- Martignoni ME & Iwai PJ.** (1986) A Catalog of Viral Diseases of Insects, Mites, and Ticks, 4th edn. USDA Forest Service PNW-195.
- Maruve D.** (2004) The innate immune response to adenovirus vectors. *Human Gene Therapy* 15:1157–1166.
- Matsuura YR, Posse RD, Overton HA, Bishop DH.** (1987) Baculovirus expression vector: the requirement for high level expression of proteins, including glycoproteins. *Journal of General Virology* 68 (Pt 5):1233-50.
- Mayer H, Bilban M, Kurtev V, Gruber F, Wagner O, Binder BR, de Martin R.** (2004) Deciphering regulatory patterns of inflammatory gene expression from interleukin-1-stimulated human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24 (7):1192-8
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF.** (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*. 84(1):92-9.
- McIntosh AH, Shamy R.** (1980) Biological studies of a baculovirus in a mammalian cell line. *Intervirology*. 13(6):331-41
- McSherry EA, Donatello S, Hopkins AM, McDonnell.** (2007) Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol Life Sci*. 64(24):3201-18. Review.
- Mendoza-Milla C, Machuca Rodríguez C, Córdova Alarcón E, Estrada Bernal A, Toledo-Cuevas EM, Martínez Martínez E, Zentella Dehesa A.** (2005) NF-

kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett.* 579(18): 3947-3952

Michiels C. (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 196(3):430-43. Review

Mogensen TH. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 22(2):240-73

Montes-Sánchez D, Ventura JL, Mitre I, Frías S, Michán L, Espejel-Nuñez A, Vadillo-Ortega F, Zentella A. (2009) Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells. *BMC Chem Biol.* 22:9:7.

Moscardi F. (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol.* 44:257-89

Moynagh PN. (2005) The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 118(Pt 20):4589-92. Review.

Müller CW, Harrison SC. (1995) The structure of the NF-kappa B p50:DNA-complex: a starting point for analyzing the Rel family. *FEBS Lett.* 369(1):113-7. Review.

MullerWA. (2002) Leukocyte – endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 82:521–533.

Muller U, Kleinberger T, Shenk T. (1992) Adenovirus E4orf4 protein reduces phosphorylation of c-Fos and E1A proteins while simultaneously reducing the level of AP-1. *J Virol.* 66:5867–5878.

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Marin DA, Goulet RJ, Sledge GW. (1997) Constitutive activation of NF-B during progression of breast cancer to hormone – independent growth. *Mol. Cell Biol.* 17 3629-3639

Nam KW, Oh GT, Seo EK, Kim KH, Koo U, Lee SJ, Mar W. (2009) Nuclear factor kappaB-mediated down-regulation of adhesion molecules: possible mechanism for inhibitory activity of bigelovin against inflammatory monocytes adhesion to endothelial cells. *J Ethnopharmacol.* 123(2):250-6.

Nathan C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846– 852

Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA. (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 247(4947):1219-22.

- Okano K, Vanarsdall AL, Mikhailov VS, Rohrmann GF.** (2006) Conserved molecular systems of the Baculoviridae. *Virology* 344(1):77-87. Review
- O'Reilly, DR, Miller, LK.** (1992) VA. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. W. H. Freeman, New York
- Pennock, G.D. et al.** (1984) Strong and regulated expression of Escherichia coli beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4, 399–406
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y.** (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 431(7007):461-6.
- Pober JS.** (2002) Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:S109-16.
- Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA.** Events at the vascular wall: the molecular basis of inflammation. (2001) *J Investig Med.* 49(1):104-11. Review.
- Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P.** (2000) The endothelial surface layer *Arch – Eur J Physiol* 440:653–666)
- Rafii S, Dias S, Meeus S, Hattori K, Ramachandran R, Feurback F, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG.** (2001) Infection of endothelium with E1–E4₊, but not E1–E4_–, adenovirus gene transfer vectors enhances leukocyte adhesion and migration by modulation of ICAM-1, VCAM-1, CD34, and chemokine expression. *Circ. Res.* 88, 903–910.
- Ramesh N, Shin YK, Lau S, Osborne WR.** (1995) High-level expression from a cytomegalovirus promoter in macrophage cells. *Hum Gene Ther.* 6(10):1323-7
- Risau W.** (1995) Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 9:926-933.
- Rohrmann, GF.** (1999) Nuclear polyhedrosis viruses. In: Webster, R.G., Granoff, A. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 2nd ed R Academic Press, London, pp. 146–152
- Rudofsky G Jr, Reismann P, Schiekofer S, Petrov D, Eynatten M, Humpert PM, Isermann B, Müller-Hoff C, Thai TP, Lichtenstein S, Bärtsch U, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A.** (2004) Reduction of postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes reduces NF-kappaB activation in PBMCs. *Horm Metab Res.* 36(9):630-8.
- Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ.** (1979) Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 279(5714):636-8.

Sarkis C, Serguera S, Petres D, Buchet JL, Ridet L, Edelman J. (2000) Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 14638-14643

Schütz A, Scheller N, Breinig T, Meyerhans A. (2006) The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus AcNPV induces functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Vaccine*. 24(49-50):7190-6

Sermsathanasawadi N, Ishii H, Igarashi K, Miura M, Yoshida M, Inoue Y, Iwai T. (2009) Enhanced adhesion of early endothelial progenitor cells to radiation-induced senescence-like vascular endothelial cells in vitro. *J Radiat Res (Tokyo)*. 50(5):469-75.

Shen HC, Yeh CN, Chen GY, Huang SF, Chen CY, Chiu YC, Hu YC. (2008) Sustained baculovirus-mediated expression in myogenic cells. *J Gene Med*. 10 (11):1190-7.

Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y. (1997) Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol*. 78 (Pt 10):2657-64.)

Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. (2009) Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*. 335(1):191-203.

Slack J, Arif BM. (2007) The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res*. 69:99-165. Review

Smith, G.E. et al. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol*. 3, 2156–2165

Springer TA. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 57:827–872.

Stark JM, Amin RS, Trapnell BC. (1996) Infection of A549 cells with a recombinant adenovirus vector induces ICAM-1 expression and increased CD-18-dependent adhesion of activated neutrophils. *Hum. Gene Ther*. 7, 1669 -1681.

Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. (2008) Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci*.(4):338-69. Review

Strahl BD, Allis CD. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403(6765):41-5.

Su WH, Chen HI, Huang JP, Jen CJ. (2000) Endothelial [Ca²⁺]_i signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. 96(12):3816-22

Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. (1993) Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today*. 14(3):111-5. Review.

Tani H, Limn CK, Yap CC, Onishi M, Nozaki M, Nishimune Y, Okahashi N, Kitagawa Y, Watanabe R, Mochizuki R, Moriishi K, Matsuura Y. (2003) In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J Virol*. 77(18):9799-808.

Tjia ST, zu Altenschildesche GM, Doerfler W. (1983) Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology*. 125(1):107-17.

Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. (2002) In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res*. 64(3):384-97

Vestweber DJ. (2000) Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *Pathol*. 190(3):281-91. Review.

Volkman LE & Blissard GW. (1995) Baculoviridae: taxonomic structure and properties of the family. In Classification and nomenclature of viruses: Sixth report of the international committee for the taxonomy of viruses. *Archives of Virology supplement* 10: 104-113

Volkman LE, Goldsmith PA. (1983) In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl Environ Microbiol*. 45(3):1085-1093

Wagle M, Jesuthasan S. (2003) Baculovirus-mediated gene expression in zebrafish. *Mar Biotechnol* (NY) 5(1):58-63.

Weber GF. (2008) Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer letters* 207: 181-190

William CA. (2007) Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms *Circ. Res*. 100:158-173

Williams MR, Kataoka N, Sakurai Y, Powers CM, Eskin SG, McIntire LV. (2008) Gene expression of endothelial cells due to interleukin-1 beta stimulation and neutrophil transmigration. *Endothelium*. 15(1):73-165.

Winstanley D, O'Reilly D. (1999). Granuloviruses. In: Webster, R.G., Granoff, A. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 2nd edR Academic Press, London, pp. 127– 130.

Xiao W. (2004) Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol*.1(6):425-35. Review.

Yap CC, Ishii K, Aoki Y, Aizaki H, Tani H, Shimizu H, Ueno Y, Miyamura T, Matsuura Y. (1997) A hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology*. 231(2):192-200.

Yoshida M, Horinouchi S. (1999) Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci*. 886:23-36. Review.

Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B. (2000) The herpes simplex virus 1 U

(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol.* 74(3):1355-63.

Zhang Y, Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15(18):2343-60. Review

Zeng J, Du J, Zhao Y, Palanisamy N, Wang S. (2007) Baculoviral vector-mediated transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:1055-106