

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
PNEUMOLOGIA**

**Transdução gênica por via endoscópica com
expressão de Ad5E1RSVhIL-10 em transplante
pulmonar em animais de grande porte**

SAULO COCIO MARTINS FILHO

Orientador

Prof. Dr. JOSÉ DA SILVA MOREIRA

Orientador no Exterior

Shaf Keshavjee, MD, MSc, FRSCS, FACS

**Tese apresentada no Programa de
Pós-graduação em Medicina: Pneumologia, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
para obtenção do grau de Doutor em Medicina.**

PORTO ALEGRE – 2002

M386t Martins Filho, Saulo Cocio
 Transdução gênica por via endoscópica com expressão de
 Ad5E1RSVhIL-10 em transplante pulmonar em animais de grande porte /
 Saulo Cocio Martins Filho – 2002.
 119 f. : 24 il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do sul, 2002.

1. Transplante de pulmão 2. Vetores adenovirais 3. Terapia Genética 4.
Interleucina-10 5. Medicina I. Título

CDU: 616.24

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra M. Milbrath Vieira CRB 10/1278

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Cláudia**, pela compreensão, carinho e determinação em Toronto, durante a confecção deste trabalho.

À minha amada filha **Mariana**, minha menina corajosa.

Ao meu pai **Saulo**, por seu exemplo e infindável apoio que incentivam a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o resultado do estímulo e colaboração de diversas pessoas e entidades que, de uma forma ou de outra, ajudaram na minha formação profissional e pessoal, às quais dedico meu maior afeto e admiração, em especial

Ao *Dr. José da Silva Moreira*, meu orientador, que acreditou neste desafio, e, com sua maneira segura e direta, tornou-o possível. O Dr. José Moreira sempre se mostrou disponível e interessado na conclusão dessa tese de Doutorado, da forma que um verdadeiro orientador deve ser. A confiança demonstrada pelo Dr. José Moreira muito nos honra de tê-lo como orientador.

Ao *Dr. José Antônio Lopes de Figueiredo Pinto*, mestre e amigo, pessoa que me fez surgir o fascínio pela cirurgia torácica através de sua dedicação e inteligência. Sentimo-nos extremamente afortunados por ter trabalhado em um ambiente fértil e repleto de história da cirurgia torácica.

Ao *Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso*, pelo desprendimento e oportunidade que me ofereceu de viver um dos momentos mais profícuos da minha carreira.

Ao *Dr. Jayme da Rocha Heck*, pela amizade com que, mesmo à distância, seguiu o empenho de efetivação desse trabalho.

Ao *Dr. Jayme Oliveira Rios*, pela sua amizade e incentivo nessa jornada.

Ao *Prof. Mário Wagner*, pela ajuda na análise estatística dos dados.

Ao *Sr. Marco Aurélio da Silva* que sempre me incentivou na realização deste trabalho e auxiliou nas diversas fases do curso de mestrado.

Nenhuma pesquisa é possível sem recursos financeiros. Portanto gostaria de agradecer ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq* - que possibilitou a um brasileiro iniciar-se na

pesquisa em um centro mundial de referência.

Também reconheço à *Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Programa de Pós-Graduação em Medicina* pela possibilidade de aprendizado e concretização dessa tese de Doutorado.

Aos membros integrantes do *Serviço de Cirurgia Torácica* do *Hospital São Lucas da PUCRS*, local em que tive a singular oportunidade de aprender e admirar esta especialidade e que sempre será minha segunda casa.

No exterior:

Ao *Dr. Shaf Keshavjee* pela oportunidade de aprender sobre o fascinante mundo do transplante de pulmões. Foi uma honra trabalhar em um ambiente intelectualmente tão fértil com uma tradição de excelência em cirurgia torácica. *Dr Keshavjee* foi um mentor excepcional ao longo de minha pesquisa no laboratório. Ele proporcionou conhecimento, direção, entusiasmo e contribuiu significativamente para o desenvolvimento de nossas habilidades clínicas e experimentais em transplante pulmonar.

Aos *Drs. Mingyao Liu e Thomas K. Waddell* pela originalidade das idéias sugeridas, contribuição a esse estudo e pelo enriquecimento pessoal. Como membros do Laboratório de Pesquisas em Cirurgia Torácica, ofereceram constantemente seus apoio e conhecimento científico.

Gostaria de agradecer particularmente ao *Dr. Marc de Perrot* que, além de grande amigo, ensinou-me diversas técnicas de laboratório e de transplante em animais. *André E. Dutly, Yumiko Imai, Monika Lodyga Shoji Sakiyama, Syed M. Quadri, Lorne Segal, Masaomi Yamane, Alejandro Chaparro, Toshi Tabata e Mark Peterson* contribuíram de maneira inestimável técnica e intelectualmente a essa pesquisa

A ajuda constante, a habilidade no laboratório e, principalmente, a espontaneidade tornou o *Dr. Ioan Mates* um amigo fraternal, a quem devo muito da realização dessa pesquisa.

A pesquisa delineada nesse manuscrito não teria sido possível sem o apoio técnico de *Xiao-Hui Bai e Paul Chartrand*. Também foi um prazer trabalhar com *Katherine Vlasova*, a qual ensinou-me a explorar várias técnicas laboratoriais.

University of Toronto, Toronto Lung Transplant Program, Multiple Organ Retrieval and Exchange Program of Ontario foram entidades que tornaram exequível a realização desta tese, as quais tenho a agradecer imensamente.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	II
DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E DE DEFINIÇÕES DE TERMOS	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO	1
Nota histórica	1
Considerações iniciais	4
Rede de citocinas e suas funções	5
Terapia gênica	12
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
Delineamento do estudo	25
Animais	25
Fases do estudo	26
Procedimento de transfecção <i>in situ</i>	32
Procedimento com os doadores	34
Procedimento com os receptores	37
Geração da recombinação do adenovírus manifestando IL-10 humana	40
Medidas da função do enxerto de pulmão	41
Amostras de tecido e plasma	43
Preparação do tecido e ELISA para citocinas	43
Imunohistoquímica para a IL-10 humana	44
Análise estatística	45
RESULTADOS	46
Expressão dose-dependente da hIL-10 em doadores <i>in vivo</i>	46
A transferência genética de hIL-10 melhora a função do enxerto de pulmão pós-transplante	49
Citocinas pró e antiinflamatórias no plasma do receptor e homogenado de pulmão	53
Inflamação pós-transfecção	62
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	80
FUTURAS DIREÇÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - O “dogma central” do papel de um gene	13
FIGURA 2 - Preparação de vetores adenovirais geneticamente modificados	17
FIGURA 3 - Mecanismo de transfecção gênica mediada por vetores adenovirais	22
FIGURA 4 - O modelo de transplante unilateral de pulmão em porcos	29
FIGURA 5 - Distribuição dos grupos nos grupos de estudo na fase II e III	31
FIGURA 6 - Procedimento de transfecção <i>in situ</i>	33
FIGURA 7 - Método usado para distribuição endobrônquica	34
FIGURA 8 - Procedimento realizado no porco doador	37
FIGURA 9 - Etapa de implante do enxerto no receptor	40
FIGURA 10 - Etapa de implante do enxerto no receptor	47
FIGURA 11 - Detecção de hIL-10 através de imunohistoquímica	48- 49
FIGURA 12 - Níveis de PaO ₂ arterial após distribuição endobrônquica de Ad5E1RSVhIL-10	50
FIGURA 13 - Níveis de PaO ₂ arterial após reperfusão do pulmão esquerdo transplantado (ESTUDO A)	50
FIGURA 14 - Níveis de PaO ₂ arterial após reperfusão do pulmão esquerdo transplantado (ESTUDO B)	51
FIGURA 15 - Expressão de hIL-10 durante o transcurso do transplante de pulmão	53
FIGURA 16 - Níveis de sIL-6 durante o transcurso do transplante de pulmão	55
FIGURA 17 - Níveis de sIL-8 durante o transcurso do transplante de pulmão	57
FIGURA 18 - Correlação entre sIL-6 e sIL-8 e a função pulmonar	59
FIGURA 19 - Verificação do processo inflamatório nas lâminas de tecidos pulmonares pós-transfecção	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Marcos históricos no desenvolvimento do transplante pulmonar	3
TABELA 2 - Principais citocinas, células produtoras e respectivas função na injúria de isquemia-reperfusão em transplante de órgãos	11
TABELA 3 - Vetores em corrente uso para transfecção gênica em humanos	15
TABELA 4 - Medidas dos parâmetros fisiológicos após transfecção gênica de Ad5E1RSVhIL-10	52
TABELA 5 - Níveis de citocinas observadas após tempo de armazenamento e 2 horas de reperfusão pós-transplante no tecido pulmonar – Estudo A	60
TABELA 6 - Níveis de citocinas observadas após tempo de armazenamento e 2 horas de reperfusão pós-transplante no tecido pulmonar – - Estudo B	61

LISTA DE ABREVIATURAS E DE DEFINIÇÕES DE TERMOS

AAV	vírus adeno-associado
Ad5BGL2	vetor adenoviral sem interleucina-10 humana “vetor vazio”
Ad5E1RSVhIL-10	interleucina-10 humana com vetor adenoviral e promotor <i>Sarcoma Rous Virus</i>
AdhIL-10	interleucina-10 humana com vetor adenoviral
AP	artéria pulmonar
APD	artéria pulmonar direita
CHM	complexo de histocompatibilidade maior
CIT	<i>cold ischemic time</i>
CMV	Citomegalovírus
CMVh	Citomegalovírus Humano
Cuff	uma estrutura de faixa pequena que cerca uma parte
DNA	ácido deoxiribonucleico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	elastância pulmonar
FiO ₂	fração de oxigênio inspirado
FNT- α	fator de necrose tumoral – alfa
GA	gases arteriais
hIL-10	interleucina-10 humana
IFN- γ	interferon-gama
IIR	injúria de isquemia e reperfusão
IL-10	interleucina 10

IL-12	interleucina 12
IL-18	interleucina 18
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IM	intramuscular
IR	isquemia-reperfusão
IV	intravenoso
Kb	<i>kilobase</i>
Kg	quilo
LITR	<i>left inverted terminal repeats</i>
LPDS	<i>low-potassium Dextran solution</i>
LPTN	<i>linphotactina</i>
mg	miligrama
ml	mililitro
PaCO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono
PaO ₂	pressão parcial de oxigênio
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i>
Pfu	<i>plaque forming units</i>
Pg/mg de proteína	picograma por miligrama de proteína
pg/ml	picogramas por mililitro
PMI-2	proteína-2 macrófago inflamatória
PPVA	pico de pressão das vias aéreas
PQM-1	proteína quimio-atraente de monócitos

RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
RSV	<i>Rous Sarcoma Vírus</i>
sIL-6	interleucina - 6 suína
sIL-8	interleucina - 8 suína
SBPD	solução com baixo potássio e Dextran
UI	Unidade Internacional
WIT	Watm Ischemic Tim

RESUMO

No presente estudo, procurou-se investigar a aplicação terapêutica potencial de AdhIL-10 em um modelo de transplante em grandes animais, buscando-se avaliar a quantidade necessária de hIL-10 transferida aos pulmões para se ter uma resposta eficiente mensurável e clinicamente relevante.

Mostrou-se, inicialmente, que a transfecção de 4×10^{10} pfu/ml de Ad5E1RSVhIL-10 em pulmão esquerdo logrou alcançar tal objetivo ($p < 0.001$). Numa segunda etapa, 2 estudos foram desenvolvidos. Estudo A - 15 animais foram alocados aleatoriamente em 3 grupos: 1- diluente (CONTROLE, n=5), 2- vetor vazio (VV, n=5), e 3- Ad5E1RSVhIL-10 (AdhIL-10, n=5). A AdhIL-10 (4×10^{10} pfu/ml) foi administrada ao doador por via endobrônquica, usando-se um broncoscópio flexível, e os animais foram ventilados por 12h antes da retirada dos pulmões. Os pulmões foram então armazenados por 18h antes de serem transplantados, e os parâmetros fisiológicos foram seguidos por 2h depois da reperfusão. Estudo B - também foram alocados randomicamente 7 animais em 2 grupos: diluente (CONTROLE, n=3), e Ad5E1RSVhIL-10 (AdhIL-10, n=4). A administração foi realizada do mesmo modo descrito previamente, os animais foram mantidos acordados e com ventilação espontânea durante 24 horas antes da retirada do órgão. Os pulmões foram a seguir armazenados durante 24 horas então serem transplantados, e avaliados por 2h após a reperfusão. Todas as citocinas foram medidas por ELISA no tecido pulmonar transplantado ao término do tempo de isquemia fria, do tempo de isquemia morna, e depois de 1h e 2h de reperfusão. Os animais doadores toleraram a entrega de gene IL-10 humano via endobrônquica sem incidentes, permanecendo hemodinamicamente estáveis ao longo do período de observação. PaO_2 e PaCO_2 dos doadores não foram significativamente diferentes entre grupos na hora de retirada do órgão. Depois de 2h de reperfusão, entretanto, o pulmão transplantado mostrou oxigenação arterial sistêmica melhorada em ambos os estudos: 511 ± 71 mmHg em AdhIL-10 versus 256 ± 182 e 423 ± 173 mmHg em VV e CONTROLE, respectivamente ($p < 0.05$ AdhIL-10 versus controle). Além disso, o pico de pressão nas vias aéreas mostrou-se mais baixo (25 ± 0.8 cmH₂O em AdhIL-10 contra 30.4 ± 1.6 e 37.3 ± 3.1 cmH₂O em VV e CONTROLE, respectivamente), e a relação de peso úmido-seco foi melhorada no grupo AdhIL-10 (6.1 ± 0.6 mg contra 7.5 ± 0.8 e 6.3 ± 0.8 mg em VV e CONTROLE, respectivamente). A expressão de IL-10 humana (hIL-10) foi 35.2 ± 13.4 e 100.1 ± 7.7 pg/mg de proteína 12h e 24h após a transfecção, respectivamente. A expressão gênica de hIL-10 no tecido pulmonar transplantado depois de 2 horas de reperfusão foi 12.4 ± 13.8 pg/mg de proteína no grupo AdhIL-10 (versus 0 e 0 pg/mg de proteína no grupos VV e CONTROLE; $p < 0.05$). No estudo B ocorreram os mesmos achados, considerando-se PaO_2 : O grupo AdhIL-10 manteve uma oxigenação sanguínea (396 ± 166 mmHg) contra uma baixa oxigenação arterial no grupo de controle (104 ± 38 mmHg); $p < 0.05$). A razão de peso úmido-seco (6.1 ± 0.4 contra 10.1 ± 0.8 mg) e o pico de pressão nas vias aéreas (24.5 ± 4.9 contra 32.1 ± 8.4 cmH₂O) mostraram-se ambos significativamente mais baixos no grupo AdhIL-10 ($p < 0.05$). A IL-8 porcina permaneceu estável nos grupos VV (92.41 ± 37.1 e 102.8 ± 130.5 pg/mg de proteína antes e depois de 2h da reperfusão, respectivamente) e CONTROLE (106.6 ± 37.5 e 95.6 ± 49.9 pg/mg de proteína antes e depois de 2h da reperfusão, respectivamente); porém, tendeu a diminuir no grupo AdhIL-10 depois da reperfusão (94.9 ± 28.7 e 79.5 ± 38.9 pg/mg de proteína antes e depois de 2h da reperfusão, respectivamente). A IL-6 porcina demonstrou uma tendência

a redução no estudo A, porém sem significado estatístico VV (0.17 ± 0.2 e 129.5 ± 41.4 pg/mg de proteína antes e depois de 2h da reperfusão, respectivamente) e CONTROLE (zero e 75.6 ± 49.1 pg/mg de proteína antes e depois de 2h da reperfusão, respectivamente); porém, tendeu a diminuir no grupo AdhIL-10 depois da reperfusão (zero e 60.4 ± 51 pg/mg de proteína antes e depois de 2h da reperfusão, respectivamente). No estudo B, a sIL-8 demonstrou uma redução estatisticamente significativa após 2 horas de reperfusão no tecido pulmonar ($p < 0.02$). 171.7 ± 92 pg/mg de proteína no grupo CONTROLE e 56.2 ± 23.5 pg/mg de proteína no grupo AdhIL-10. Da mesma forma, demonstrou-se uma redução dos níveis de sIL-6 no estudo B 2 horas após a reperfusão pulmonar, tanto no tecido pulmonar ($p < 0.03$), quanto no plasma do receptor ($p < 0.002$).

ABSTRACT

In the present study, it was tried to investigate the potential therapeutic application of AdhIL-10 in a transplant model in large animals, in order to evaluate the necessary amount of hIL-10 transferred to the lungs to have a measurable and clinically relevant gene transfection.

We proved that 4×10^{10} pfu/ml of Ad5E1RSVhIL-10 into left lung reached this goal ($p < 0.001$). Secondly, we runned 2 studies: study A -15 animals were randomly allocated into 3 groups: 1: diluent (CONTROL, n=5), 2: empty vector (EV, n=5), and 3: Ad5E1RSVhIL-10 (AdhIL-10, n=5). AdhIL-10 (4×10^{10} pfu/ml) was administered endobronchially via fiberoptic bronchoscope to the donor and animals were ventilated for 12h prior to lung retrieval. The lungs were then stored for 18h prior to transplantation, and followed by 2h of reperfusion. Study B – 7 animals were also randomly allocated into 2 groups: diluent (CONTROL, n=3), and Ad5E1RSVhIL-10 (AdhIL-10, n=4). The administration was done as the same way described previously, but the animals were kept awake for 24 hours prior to lung retrieval. The lungs were stored for 24 hours prior to transplantation and followed 2h of reperfusion. All cytokines were measured by ELISA in transplanted lung tissue at the end of the warm ischemic time, and after 1h and 2h of reperfusion. Donor animals tolerated the endobronchial gene delivery without incident and remained hemodynamically stable throughout the observation period. Donor PaO₂ and PaCO₂ were not significantly different between groups at the time of retrieval. After 2h of reperfusion, the transplanted lung showed improved oxygenation in both studies (511±71 mmHg in AdhIL-10 group vs. 256±182 and 423±173 mmHg in EV and CONTROL respectively $p < 0.05$ AdhIL-10 versus control). In addition, the peak airway pressure was lower (25±0.8 cmH₂O in AdhIL-10 versus 30.4±1.6 and 37.3±3.1 cmH₂O in EV and CONTROL, respectively), and the wet-to-dry weight ratio was improved in the AdhIL-10 group (6.1±0.6 mg versus 7.5±0.8 and 6.3±0.4 in EV and CONTROL, respectively). Human IL-10 (hIL-10) expression was 35.2±13.4 and 100.1±7.7 pg/mg protein after 12h and 24h of transfection, respectively. hIL-10 gene expression in transplanted lung tissue after 2 hours of reperfusion was 12.4±13.8 pg/mg protein in the AdhIL-10 group (vs. 0 and 0 pg/mg in EV and CONTROL groups $p < 0.05$). In study B occurred the same findings regarding PaO₂: the AdhIL-10 group showed a maintained blood oxygenation (396±166 mmHg) versus a poorly oxygenated arterial blood in CONTROL group (104±38, $p < 0.05$). The wet and dry ratio (6.1±0.4 versus 10.1±0.8) and Peak Airway Pressure (24.5±4.9 versus 32.1±8.4) were lower in AdhIL-10 group ($p < 0.05$). Swine IL-8 remained stable in EV (92.41±37.1 and 102.9±130.5 before and after 2h reperfusion, respectively) and CONTROL (106.6±37.5 and 95.6±49.9 before and after 2h reperfusion, respectively), whereas it tended to decrease in AdhIL-10 group after reperfusion (94.9±28.7 and 79.5±38.9 before and after 2h reperfusion, respectively). Porcine IL-6 had showed a tendency for reduction in the study A, even so without statistical meaning EV (0.17±0.2 and 129.5±41.4 pg/mg of protein before and after 2 hours of reperfusion, respectively) and CONTROL (zero and 75.6±49.1 pg/mg of protein before and after 2 hours of reperfusion, respectively). However, it tended to decrease in the AdhIL-10 group after the reperfusion (zero and 60.4±51 protein pg/mg

before and after 2 hours of reperfusion, respectively). In the study B, sIL-8 demonstrated a statistically significant reduction after 2 hours of reperfusion in the lung tissue ($p < 0.02$). 171.7±92 pg/mg of protein in the CONTROL group and 56.2±23.5 pg/mg of protein in the AdhIL-10 group. The same findings, a reduction of the levels of sIL-6 was demonstrated in the study B 2 hours after the lung reperfusion, as much in the lung tissue ($p < 0.03$), as in the plasma of the receptor ($p < 0.002$).

INTRODUÇÃO

Nota Histórica

A história do transplante pulmonar inicia em 1950, com Demikhov, um fisiologista russo que realizou um transplante lobar experimental, e com Metras, na França, que publicou o primeiro alotransplante de pulmão esquerdo bem-sucedido em cães. A técnica originalmente descrita por Metras é essencialmente a mesma em corrente uso. Em particular, a anastomose venosa é feita usando um *cuff* atrial, a fim de obter uma maior superfície de tecido e com a vantagem de limitar em somente uma anastomose nas veias pulmonares.

O primeiro transplante pulmonar em humanos foi realizado pelo Dr. James D. Hardy - *University of Mississippi Medical Center* - em 1963. O paciente era um prisioneiro de 58 anos com um avançado carcinoma brônquico invadindo o mediastino. Esse paciente faleceu 18 dias após o transplante devido à falência renal e uremia. Em 1964, Meshalkin e colaboradores realizaram um bem-sucedido reimplante de pulmão no intuito de curar uma asma brônquica intratável. Embora a patologia primária não tenha sido resolvida, essa cirurgia demonstrou que o autotransplante em humanos poderia ser feito com êxito.

Entre 1963 e 1983, cerca de 40 aloenxertos pulmonares clínicos foram tentados, mas somente um receptor logrou alta hospitalar, indo contudo ao óbito 8 meses depois do transplante, devido a uma sepse de curta duração. O primeiro

transplante de pulmão clinicamente bem-sucedido foi finalmente realizado em 1983, em Toronto (Canadá), pelo *Toronto Lung Transplant Group*. O mesmo grupo também realizou o primeiro transplante bilateral de pulmão do mundo, 3 anos depois, em uma paciente de 42 anos com enfisema pulmonar terminal. Esta paciente acabou falecendo 15 anos mais tarde de uma hemorragia cerebral, com pulmões funcionantes.

Desde 1983, o transplante pulmonar tem evoluído a ponto de se tornar o tratamento de escolha para doenças pulmonares terminais. Até a presente data, cerca de 10.000 transplantes de pulmões já foram realizados em todo o mundo, e mais de 1.000 transplantes são efetuados anualmente (Hosenpud *et al.*, 1998; Hosenpud *et al.*, 1999; Hosenpud *et al.*, 2000). Aprimoramentos em técnicas para preservação pulmonar aumentaram significativamente a disponibilidade de órgãos. No entanto, mesmo quando há sucesso do transplante do pulmão, aproximadamente 20% dos pacientes desenvolvem severa injúria de reperfusão e necessitarão de suporte por longo tempo com ventilação mecânica com pressão positiva, terapia farmacológica e ocasionalmente oxigenação extracorpórea por membrana. Além da alta mortalidade no período pós-operatório imediato, a injúria severa de reperfusão pode estar associada ao risco de rejeição aguda, a qual pode levar à disfunção do enxerto em longo prazo (Patterson & Cooper, 1995; Trulock *et al.*, 1997).

A última década tem sido marcada pelo melhor entendimento dos mecanismos de lesão de reperfusão, que se traduz em melhores técnicas de preservação. Uma solução de preservação específica para os pulmões – baixo-potássio e dextran – foi desenvolvida e introduzida com êxito na prática clínica (Keshavjee *et al.*, 1992). Esses avanços levaram a uma significativa melhora nos resultados. No entanto, a injúria

de isquemia-reperfusão (IIR) ainda permanece como uma temível complicação. No futuro, refinamentos técnicos e o melhor entendimento desse intrincado processo de lesão celular levarão a melhores estratégias terapêuticas e aperfeiçoamentos nos transplantes de órgãos em seres humanos.

Tabela 1- Marcos históricos no desenvolvimento do transplante pulmonar

Tabela 1. Marcos Históricos no Transplante Pulmonar.	
1950	Primeiro transplante pulmonar com êxito em cães
1963	Primeiro alotransplante pulmonar em humanos
1964	Autotransplante pulmonar em humanos
1983	Primeiro alotransplante de pulmão bem-sucedido com longa sobrevida
1986	Primeiro transplante bilateral seqüencial de pulmão em humanos

No Brasil, o grupo de transplantes do Pavilhão Pereira Filho da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre-Rio Grande do Sul foi o pioneiro no transplante de pulmão (Camargo, 1987). O receptor foi um homem branco, de 27 anos de idade, portador de pneumopatia mista com fibrose e bronquiolite obliterante. Até o presente momento, cerca de 100 transplantes de pulmão foram realizados nessa instituição. Em 2000, 24 transplantes pulmonares cadavéricos foram realizados no Brasil. Nesse ano havia 8 centros autorizados à realização dessa cirurgia (Medina-Pestana *et al.*, 2002).

Considerações Iniciais

Embora considerável progresso tenha ocorrido desde 1983 com o primeiro transplante de pulmão humano bem-sucedido, com longo período de sobrevivência do receptor (*Toronto Lung Transplant Group, 1986; Toronto Lung Transplant Group, 1988*), a disfunção do enxerto crônica continua sendo um dos principais problemas encontrados, traduzindo-se em uma taxa total de sobrevivência de somente 50% em 5 anos (Hosenpud *et al.*, 2000). Várias estratégias têm sido tentadas para limitar as lesões no pulmão transplantado (Eppinger *et al.*, 1995; Kirk *et al.*, 1993; Novick *et al.*, 1992). No entanto, os sucessos no uso dessas abordagens se mostram variados.

Como com outras formas de transplante de órgãos, há, no que diz respeito ao pulmão, ainda uma significativa escassez de doadores de órgãos disponíveis. Aproximadamente 22% dos pacientes morrem durante o primeiro ano após serem listados enquanto esperam por um órgão adequado. Após dois anos na lista de espera, a mortalidade é quase dobrada, aproximadamente 42% (Geertsmaa *et al.*, 1998). Adicionalmente, o transplante de pulmão humano é limitado pelo fato de que só aproximadamente 10 a 20% dos potenciais doadores permanecem com órgãos adequados para a enxertia, devido a fatores como trauma, edema pulmonar e aspiração (Egan *et al.*, 1992; Sundaresan *et al.*, 1995; Pierre *et al.*, 2002). Durante os últimos anos, tentando aliviar a escassez de órgãos, têm-se estendido os critérios para aceitabilidade de doadores de pulmão. Contudo, Pierre e colaboradores demonstraram que essa atitude pode potencialmente aumentar o risco de lesão de isquemia-reperfusão (Pierre *et al.*, 2002).

A injúria de isquemia-reperfusão (IIR) continua sendo um problema central no transplante de pulmão, podendo resultar em falência pulmonar, falência múltipla dos órgãos e morte. O entendimento dos intrincados mecanismos de IIR, e o desenvolvimento paralelo de estratégias para preservação específica do pulmão têm sido motivo de intensos estudos na última década (Cooper *et al*, 1992; Date *et al*, 1993; De Campos *et al*, 1998a; De Campos *et al*, 1998b, De Campos *et al*, 1999; Gammie *et al*, 1999; ;Giliard *et al*, 1990; Hasleton & Doran, 1996; Sakamaki *et al*, 1997), culminando na aplicação clínica bem-sucedida desses conceitos e o uso de uma solução de preservação pulmonar específica - *Low-potassium Dextran Solution (LPDS)*, ou Solução de Baixo-Potássio Dextran (Fischer *et al.*, 2000). A injúria de isquemia-reperfusão ainda ocorre em mais de 20% dos já escassos pulmões transplantados. Faz-se necessário o aprofundamento no conhecimento dos mecanismos da IIR, buscando-se reduzir a incidência dessa importante causa de insucesso nos enxertos, otimizando-se, assim, a eficiência do transplante.

Rede de citocinas e suas funções

Citocinas são mensageiros protéicos que atuam de uma maneira autócrina e parácrina. Historicamente, as citocinas são mencionadas como monocinas ou linfocinas dependendo basicamente se a fonte de produção e síntese fosse monócitos/macrófagos ou linfócitos, respectivamente. Estudos subseqüentes demonstraram que a produção dessas substâncias não estava restrita apenas a linfócitos e monócitos/macrófagos, e o termo citocina (do grego *κυτο* – *cyto* = *célula*; *kine* = *movimento*) acabou sendo escolhido e amplamente empregado. No 6º Congresso Internacional de Imunologia foi introduzido o termo interleucina, para definir as citocinas sintetizadas por leucócitos, com ação primordial nessas células sanguíneas (Dinarello & Mier, 1987; *WHO-IUIS*,

1992).

Há atualmente uma clara evidência de que as citocinas atuam de uma forma muito importante, mesmo na homeostasia fisiológica normal, e que um grande número de células relacionadas ao sistema imune pode produzir citocinas. Além disso, citocinas participam na iniciação, perpetuação e resolução do processo inflamatório como o observado durante a injúria de isquemia-reperfusão (Daemen *et al.*, 1999; Wanner *et al.*, 1996; Frangogiannis *et al.*, 1998; Serrick *et al.*, 1994). A importância da rede de citocinas baseia-se no fato de que um número relativamente pequeno de mediadores pode iniciar uma resposta inflamatória intensa e que essa resposta está sob o controle de vários passos regulatórios. Conseqüentemente, essa interação pode potencialmente ser interrompida através da supressão precoce da resposta citocínica com anticorpos específicos e/ou através do aumento de citocinas imunoregulatórias, como a interleucina-10 (IL-10) - uma citocina antiinflamatória secretada por vários tipos de células, que inibe a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias e participa ativamente no processo de cicatrização (Frangogiannis *et al.*, 2000). Em um modelo em ratos, Fischer e co-autores demonstraram que a administração transtraqueal de gene IL-10 humano no pulmão do doador, mediada por vetores adenovirais antes da retirada do órgão, melhora a função pulmonar e diminui as citocinas pró-inflamatórias depois da reperfusão (Fischer *et al.*, 2001).

Um importante aspecto dessa rede de citocinas é o recrutamento de uma subpopulação específica de leucócitos para a área de inflamação. Até o presente momento, 40 citocinas quimiotáticas (quimocinas) foram identificadas. Baseando-se na cadeia exposta nas duas primeiras cisteínas, as quimocinas são identificadas em 4

classes: CXC, CC, C e CX3C, das quais a maioria pertence às classes CC e CXC. Dentre as quimocinas CXC, a IL-8, um potente fator quimiotático neutrofílico, tem função central na síndrome de distrição respiratória do adulto (SDRA) (Miller *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 1993).

Receptores de quimocinas representam alvos potenciais para o desenvolvimento de antagonistas de baixo peso molecular e para anticorpos bloqueadores humanos. Até o momento, mais de 18 receptores de quimocinas foram identificados e nomeados de acordo com a subfamília de quimocinas a que pertencem: CXCR1 a CXCR5 para as quimocinas CXC; CCR1 a CCR9, com as quimocinas CC; XCR1 às quimocinas C, Lptn; e CX3CR1 às quimocinas CX3C, fractalquina e neurotactina. Nenhum antagonista desses receptores foi ainda testado em ensaios clínicos, todavia, espera-se que isto seja efetuado nos próximos anos, buscando-se eventuais benefícios práticos de sua utilização.

Um considerável número de estudos confirmou a importância das citocinas na injúria aguda de pulmão (Boehler *et al.*, Boehler *et al.*, 1999; El Gamel *et al.*, 1999; Elssner *et al.*, 2000; Jeppson *et al.*, 1998; Minter *et al.*, 2000; Neuringer *et al.*, 2000; Rizzo *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1999; Waddell *et al.*, 1996; Wam *et al.*, 1997; Xavier *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1996). No entanto, poucos estudos analisaram o perfil das citocinas durante isquemia-reperusão pulmonar. Essas análises evidenciaram que fator de necrose tumoral-alfa (FNT- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), e proteína-1 quimio-atraente de monócitos (PQM-1) são rapidamente mobilizados durante a isquemia e/ou após a reperusão (Serrick *et al.*, 1994; Khimenko *et al.*, 1998; Chang *et*

al., 1997; Pham *et al.*, 1992; Mal *et al.*, 1998). Estudos em diferentes centros de pesquisa provaram que a lesão pulmonar pode ser reduzida na fase inicial da reperfusão através do bloqueio de PQM-1, FNT- α e IFN- γ (Serrick *et al.*, 1994; Eppinger *et al.*, 1997). Recente trabalho científico em camundongos tratados com anticorpos monoclonais mostrou que interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18) e proteína-2 macrófago inflamatória (PMI-2, homóloga da IL-18 em ratos) poderiam estar envolvidas na IIR, bem como outras citocinas, i.e. IL-1, IL-4, IL-11, FNT- α , linfócitos CD4⁺ (Aversa *et al.*, 1993; Cassatella *et al.*, 1993; Colletti *et al.*, 1990; Daemen *et al.*, 1999; Denham *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2001; Kluth *et al.*, 2001; Lentsch *et al.*, 1998; Lentsch *et al.*, 1999; Rogy *et al.*, 2000; Tipping *et al.*, 2000; Trepicchio *et al.*, 1999; Zwacka *et al.*, 1997). Até o momento, há trabalhos somente em pequenos animais analisando a modulação das citocinas durante a isquemia e reperfusão em transplantes de pulmão.

Estudos em ratos têm identificado muito dos mediadores que estão envolvidos na regulação da lesão pulmonar de isquemia-reperfusão (Eppinger *et al.*, 1997). Diversos estudos têm sistematicamente mostrado que as citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos, células epiteliais e monócitos são componentes significantes desse processo (Khimenko *et al.*, 1998). Em transplantes de pulmão humano, o grupo de Toronto observou que a interleucina-8 (IL-8) aumenta significativamente nos pulmões de doadores que subseqüentemente desenvolveram intensa disfunção de enxerto imediatamente após a reperfusão. (de Perrot *et al.*, 2002).

Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica com uma função central na rede de citocinas que mantém homeostasia. A seqüência de cDNA da IL-6 é composta

por uma seqüência de 212 aminoácidos. A IL-6 de pequenos mamíferos tem aproximadamente 40% de sua seqüência identificada com a IL-6 humana. A IL-6 humana é ativa em células de rato, mas o IL-6 de roedores não demonstra atividades em células humanas. A IL-6 participa praticamente de todas as reações de homeostasia do corpo humano. Além disso, a interleucina-6 é o maior mediador da fase de reação aguda, de respostas imunes, função da célula nervosa, hematopoiese e remodelagem de osso (Hirano *et al.*, 1998; Hibi *et al.*, 1996; Taga & Kichimoto, 1997; Van Snick *et al.*, 1990; Barton, 1997). A IL-6 encontra-se muito elevada em pacientes transplantados de pulmão com rejeição celular aguda refratária (Iacono *et al.*, 1997), enxertos de pulmão pobremente preservados (Pham *et al.*, 1992), no desenvolvimento de bronquiolite obliterante (Scholma *et al.*, 2000) e em hipotensão sistêmica no início do período pós-operatório de transplante de pulmão (Mal *et al.*, 1998). Yoshida e colaboradores (1993) descreveram os benefícios do monitoramento de IL-6 após o transplante de pulmão como marcador de disfunção do enxerto. Níveis séricos altos de IL-6 são também produzidos em infecção pulmonar (Baarsch *et al.*, 1995), terapia fotodinâmica (Usuda *et al.*, 2001) e após intervenção cirúrgica (Sakamoto *et al.*, 1994). Interessantemente, a IL-6, geralmente considerada uma citocina inflamatória, tem também importantes funções antiinflamatórias (Barton, 1997).

Citocinas antiinflamatórias têm sido exploradas como modalidades terapêuticas para prevenir e/ou melhorar lesões relacionadas à inflamação (Armstrong *et al.*, 1996; Barbar *et al.*, 2000; Benhamou *et al.*, 1996; Bolmann III, 1998; Brauner *et al.*, 1997; De Waal Malefyt *et al.*, 1991; De Waal Malefyt *et al.*, 1993; Fabrega *et al.*, 1996; Finkelman *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2001; Isowa *et al.*, 1999; Kingston *et al.*, 2001; Krakauer, 2002; Lane *et al.*, 1997; Lau *et al.*, 2000; Le Moine *et al.*, 1997; Liu &

Slutsky, 1997; Liu *et al.*, 2000; Miwa *et al.*, 1998; Morrison & Murtaugh, 2001; Muruve *et al.*, 1999; Pierre *et al.*, 1998 b; Poston *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 1997; Tashiro *et al.*, 2000; Wam *et al.*, 1997; Yoshidome *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). A interleucina-10 (IL-10) foi originalmente descrita como um fator inibidor de citocinas (Howard & O'Garra, 1992; Moore *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* têm confirmado a habilidade da IL-10 para impedir a apresentação de células ao antígeno (inclui-se monócitos, células de Langerhans e células dendríticas) pelas propriedades inibitórias de expressão Complexo de Histocompatibilidade Maior (CHM) Classe II e citocinas pelos macrófagos e neutrófilos (D'Andrea *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1997). A IL-10 administrada através de transferência gênica tem sido apontada como uma estratégia válida para mitigar significativamente o desenvolvimento de rejeição do enxerto e prolongar a sobrevivência de modelos roedores em transplantes cardíacos e de fígado (Daemen *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1997). Alguns estudos mostraram haver um efeito protetor da IL-10 recombinante em lesões pulmonares agudas induzidas por injúria de isquemia-reperfusão (Chum *et al.*, 1999; Eppinger *et al.*, 1996; Itano *et al.*, 2000 a; Itano *et al.*, 2000 b; Li *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2000; Rogy *et al.*, 1995). A transferência genética de IL-10 no pulmão previamente ao transplante pode teoricamente ser suficiente para impedir a reação inflamatória iniciada logo após a reperfusão, além de inibir a atividade de macrófagos (Ding *et al.*, 1993). Morrison e colaboradores (2000) demonstraram que a terapia gênica com IL-10 poderia ser utilizada para amenizar as modificações inflamatórias produzidas por uma pneumonia bacteriana. Li, C. e co-autores (1999) evidenciaram que uma deficiência de IL-10 leva a um aumento da virulência da malária em modelos animais.

A tabela 2 sumariza as fontes e as específicas funções das citocinas potencialmente envolvidas na injúria de isquemia-reperfusão.

Tabela 2 – Principais citocinas, células produtoras e respectivas função na injúria de isquemia-reperfusão em transplante de órgãos.

CITOCINA	PRINCIPAIS CÉLULAS PRODUTORAS	FUNÇÃO
Fator de Necrose Tumoral-α	Macrófagos, Linfócitos	Pró-inflamatória
Interferon-γ	Linfócitos	Pró-inflamatória
<i>Macrophage Chemoattractant Protein-1</i>	Células imunes, células epiteliais pulmonares	Quimiotaxia de macrófagos
Interleucina-1β	Macrófagos, fibroblastos	Ativação celular
Interleucina-2	Linfócitos	Proliferação Linfocitária
Interleucina-6	Macrófagos, células endoteliais e células epiteliais	Pró-inflamatória
Interleucina-8	Células imunes, células epiteliais pulmonares e fibroblastos	Quimiotaxia de neutrófilos
Interleucina-10	Macrófagos, linfócitos	Antiinflamatória
Interleucina-12	Macrófagos	Pró-inflamatória
Interleucina-18	Macrófagos	Pró-inflamatória

Terapia gênica

O objetivo da terapia gênica é a modificação fenotípica na estrutura ou função de células, tecidos e órgãos pela transformação da composição genética do hospedeiro. A terapia genética mostra-se como o tratamento definitivo para doenças hereditárias. Nessa situação, os genes defeituosos ou ausentes poderiam ser reparados pela reposição de uma população de células-alvo, usando-se um vetor apropriado para transferência genética. O desenvolvimento da modificação genética terapêutica, como um tratamento viável, surgiu devido ao interesse crescente nas pesquisas nos últimos 50 anos, levando ao “dogma central” da função do gene: cromossomos são constituídos de DNA, os quais contêm a informação genética, que é transcrita no RNA mensageiro (RNAm), e este se traduz em proteínas (Figura 1). A continuidade das pesquisas permitirá o conhecimento de métodos capazes de identificar e caracterizar os genes e suas mutações. Disso resulta a hipótese que repondo os genes mutantes por uma cópia normal poder-se-ão curar doenças causadas por essa mutação genética única. Adicionalmente, esta hipótese significa que ao se transferirem genes com ações benéficas ou protetoras poder-se-ia aplicar tal conduta para conter ou curar doenças adquiridas.

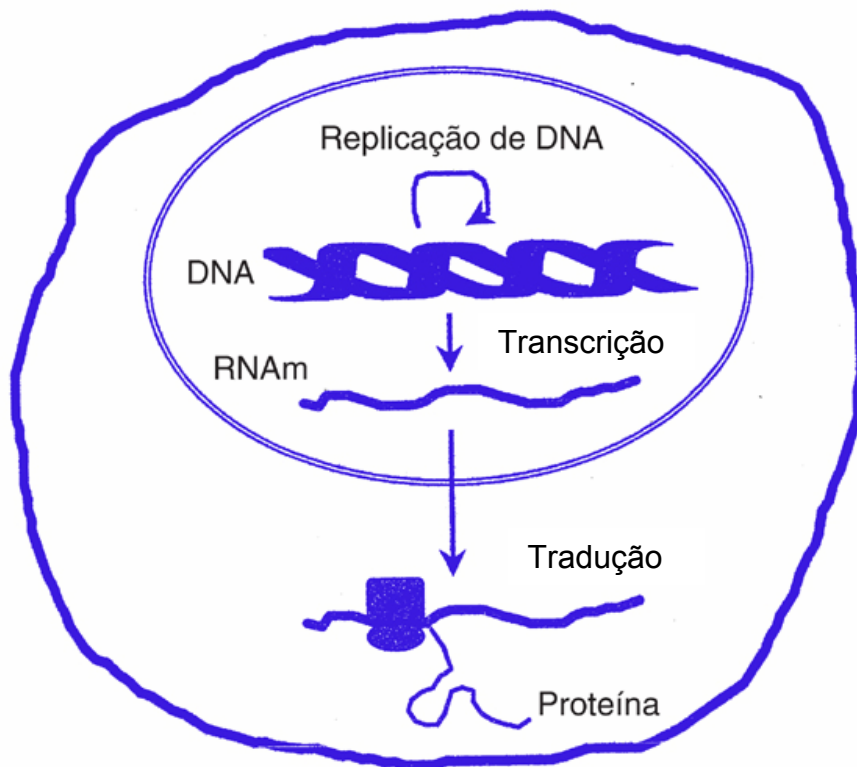


Figura 1. O “dogma central” do papel de um gene. A informação genética é armazenada no núcleo celular como DNA, que serve como um molde para sua própria duplicação. A informação genética é transcrita em RNAm, o qual é transportado para fora do núcleo. Os ribossomos traduzem o RNAm em proteína.

A aplicação da terapia gênica, experimentalmente ou em uso clínico, requer um processo de entendimento de etapas fundamentais (Anderson, 1984). Primeiro, uma completa compreensão da fisiopatologia da doença a ser tratada é fundamental para programar a terapêutica gênica apropriada e prever acuradamente suas ações potenciais. Posto que essa assertiva seja adequada para doenças causadas por uma única mutação genética, ela é também válida para aplicação em doenças adquiridas, as quais podem ter componentes fisiopatológicos multifatoriais que estão sujeitos a ampliações, inibições ou outras mudanças.

Assim que esse objetivo tenha sido atingido, a apropriada terapia gênica deve ser formulada. Portanto, a próxima etapa será ganhar acesso ao gene terapêutico proposto. Isto vem sendo alcançado com as pesquisas e os novos conhecimentos proporcionados pelo desvendamento do genoma humano – *Human Genome Project*.

A terceira etapa caracteriza-se pela inserção do gene terapêutico em um vetor que transportará para as células-alvo onde a expressão gênica faz-se necessário. Embora transferência direta de DNA tenha sido obtida em tecido muscular, sua eficiência mostrou-se extremamente baixa, sugerindo que sua aplicabilidade em outros tecidos seja também bastante limitada (Wolff *et al.*, 1990). Vírus e lipossomos contendo genes inseridos como sistemas de distribuição ou “vetores” é que têm sido desenvolvidos no sentido de se obter a tão esperada transferência gênica efetiva.

Os vetores correntemente em uso para transfecção gênica em humanos incluem vírus modificados, como retrovírus com replicação-deficiente, adenovírus, adenovírus associados, vetores não-virais e lipossomos catiônicos. Há vantagens e desvantagens em cada uma das classe desses vetores (Tabela 3).

Tabela 3 – Vetores em corrente uso para transfecção gênica em humanos e suas respectivas características de construção, capacidade insercional, células-alvo, eficiência, duração de expressão, resposta imune do receptor, titulação, risco potencial, competência de replicação viral e expressão de proteína viral (Cassivi *et al*, 2000).

	<i>Naked DNA</i>	Lipossomos Catiônicos	Retrovírus	Adenovírus	AAV
Construção Inicial	Duplo-filamento de plasmídeo DNA	Duplo-filamento de DNA com núcleo lipossômico	Filamento simples de RNA com capsídeo viral	Duplo-filamento de DNA com capsídeo viral	Filamento simples de DNA com capsídeo viral
Capacidade de Inserção (kb)		>10	<6	7 a 10	6 a 7
Células-Alvo	músculo e ?	Replicação e/ou repouso	Somente em replicação	Replicação e/ou repouso	Replicação; em repouso ?
Eficiência de Distribuição Gênica <i>In Vivo</i>	Extremamente baixa	Baixa	Moderada – Alta	Moderada - Alta	Baixa - Moderada
Duração da Expressão Transgênica	Muito instável	Transitória	Estável	Transitória	Transitória - Longo tempo
Imunidade Potencial do Hóspedeiro	Sim	Sim	Mínima	Sim	Sim
Titulação (<i>pfu/mL</i>)			$10^6 - 10^7$	$10^8 - 10^{10}$	$10^6 - 10^8$
Risco Potencial	Resposta Inflamatória	Resposta Inflamatória	Mutagênese Insercional	Resposta Inflamatória	Toxicidade da proteína viral e mutagênese insercional
Competência de Replicação Viral			Não	Provável	Sim
Expressão de Proteína Viral			Não	Sim	Não

Abreviações: AAV, vírus adeno-associado; kb, kilobase; *pfu*, plaque forming units; ml, mililitro

A construção de vírus com déficit de replicação, no qual os componentes genéticos necessários para reprodução são removidos requer os seguintes passos (Figura 2): o gene exógeno é inserido em um veículo baseado em DNA que contém porções do genoma viral, porém no qual um ou mais genes necessários para replicação foram retirados. Esse veículo é então transportado para uma célula previamente transfectada, esta contendo os genes virais necessários para replicação. Assim, a maquinaria para produção de capsídeo viral e a distribuição de DNA para o núcleo estará disponível, enquanto que os componentes originais necessários para replicação viral não estarão mantidos no vírus recombinante. Todavia o tamanho do gene terapêutico a ser inserido é limitado. De um modo geral, esse tamanho não pode ser significativamente maior que a quantidade inicial de DNA retirado do vírus “selvagem”.

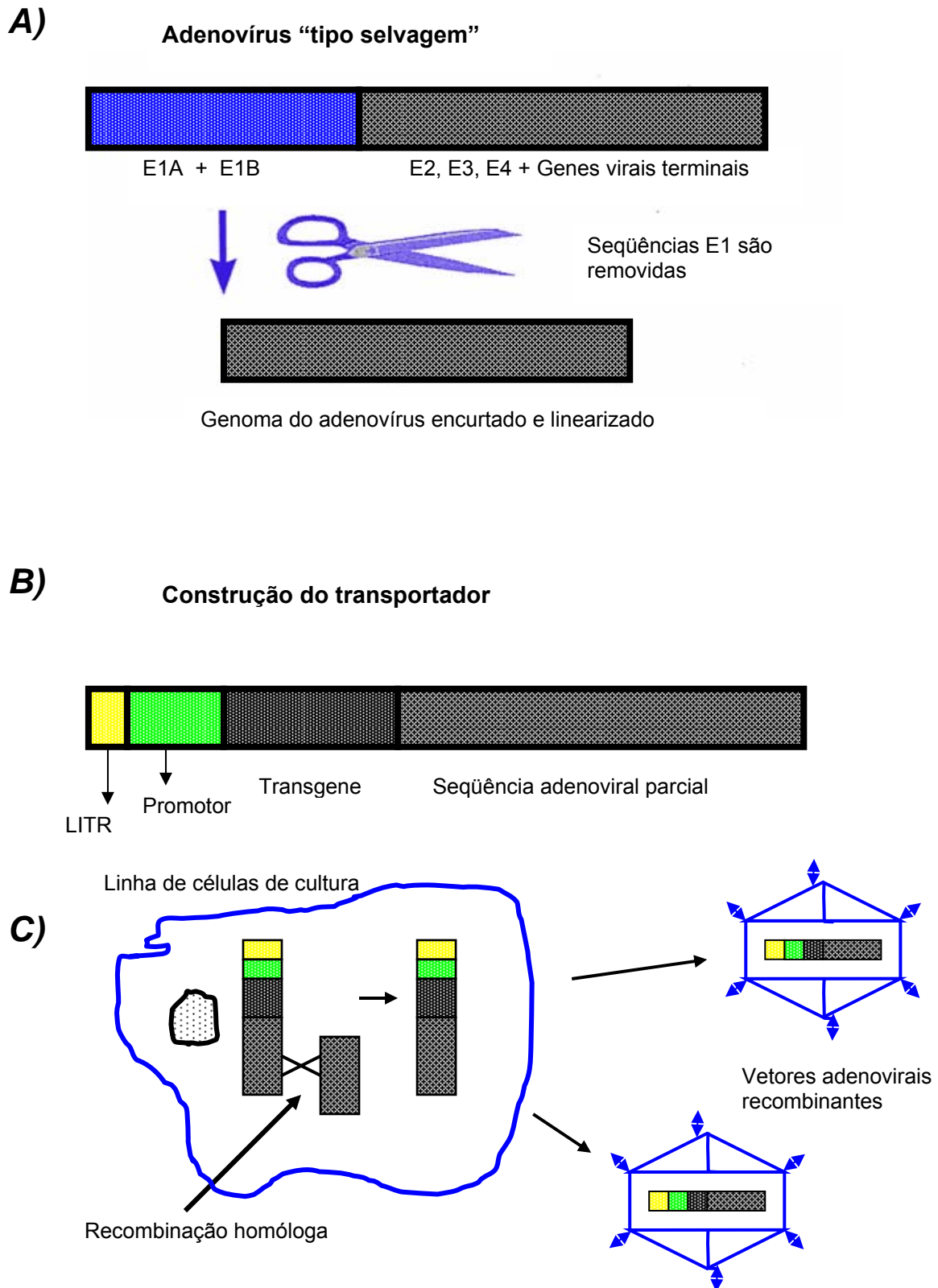


Figura 2. Preparação de vetores adenovirais geneticamente modificados: a) Genes virais de replicação E1A e E1B são removidos do genoma de um adenovírus tipo 5 e expostos horizontalmente; b) um transportador plasmídeo é construído contendo o gene de interesse; c) células de base, e.g. 293 cells, são cotransfectadas com o genoma adenoviral encurtado e o plasmídeo. As células de base fornecem a função replicadora (E1) in trans. Após a recombinação homóloga, os vetores virais deficientes em replicação são produzidos (*LITR – Left Inverted Terminal Repeats*).

Retrovírus são vírus eucarióticos com um filamento simples de RNA capazes de uma transfecção gênica altamente eficiente para células em fase de replicação, com uma subsequente expressão transgênica duradoura devido à modificação permanente no genótipo celular do hospedeiro e para sua progênie (Wong *et al.*, 1997) . Outra vantagem dos retrovírus é a relativa simplicidade de construção de vetores sem genes retrovirais intactos.

Essa classe de vetores, no entanto, é limitada por sua inaptidão de agir em células em repouso mitótico (Miller *et al.*, 1990). A produção de quantidade suficiente de vírus é também um problema, pois as células matrizes podem produzir no máximo 10^7 plaque forming unit per mililiter (pfu/ml) (Tzeng *et al.*, 1996). A capacidade de carregamento retroviral (tamanho da seqüência do gene externo a ser inserida) é significativamente limitada a um comprimento total menor que 6 quilobases (Curiel *et al.*, 1996). Há um perigo real de uma mutagênese insercional associada a uma integração não desejada de material genético transferido. Além disso, existe apreensão relacionada à expressão demasiadamente crônica do material genético inserido. Deve-se salientar que vetores retrovirais são extremamente lábeis *in vivo*, assim como são facilmente inativados pelo complemento e outros componentes do sistema imune. Retrovírus para aplicação *in vivo* são, portanto, significativamente restritos.

Lipossomos catiônicos são outro sistema de vetores usados para transferência de material genético para células-alvo. O complexo lipídico-DNA age encobrendo as cargas de DNA negativas e facilitando a penetração na célula através de fusão não-específica na membrana, ou seja, sem direcionar a um receptor de membrana em particular.(Felgner *et al.*, 1987; Freimark *et al.*, 1998; Mannino & Gould-Fogerite,

1988). Essa falta de especificidade a um receptor permite que a transfecção por lipossomos tenha uma ampla variedade de células-alvo. Lipossomos podem ser empregados para transferir relativamente longas seqüências de DNA quando comparados a outros modelos de vetores. Além disso, os lipídios catiônicos são menos imunoestimuladores (Itano *et al.*, 2001). Boasquevisque e co-autores (1999) revisam que vários fatores interferem na eficiência da transfecção lipossomo-mediada: o lipídio neutro usado, a estrutura do lipídio catiônico, o tamanho da partícula lipossomal e fatores teciduais do receptor influenciam no resultado final da transferência gênica. Entretanto esses vetores são limitados pela pouca atividade *in vivo*, a qual é muito transitória (Nabel *et al.*, 1993 a; Nabel *et al.*, 1993 b).

Usando o modelo de transplante de pulmão esquerdo em ratos, Cassivi e colaboradores (1999 a; 1999 b; 2000) provaram que, usando a via aérea para administração do complexo Vetor-Cdna, a transfecção de um gene de informação para o pulmão doador *in vivo*, ou seja, antes da retirada do órgão, é superior à transfecção de pulmões *ex vivo*. Eles também apresentaram nesse estudo que a transfecção se dá somente no órgão alvo, evitando-se a indesejada contaminação adenoviral no pulmão contralateral do animal doador, e outros órgãos como fígado coração e rim.

Em um cenário de doença pulmonar, adenovírus recombinantes, constituído por duplo filamento de DNA e um revestimento capsídeo protéico descoberto, são os vetores mais estudados (Curiel *et al.*, 1996). Os dois serotipos mais freqüentemente usados, 2 e 5, têm um tropismo natural pelo epitélio respiratório.

Vetores adenovirais são construídos pela inserção de seqüências gênicas terapêuticas no lugar do genoma viral responsável pela replicação. Essas funções replicativas são fornecidas "in trans" por um pacote de células matrizes previamente transfectadas, *i.e.* células matrizes embriônicas renais-293. Comumente, os vetores adenovirais elaborados para transfecção em tecido pulmonar contêm como seqüência promotora citomegalovírus humano (CMVh). Vários autores demonstraram a alta eficiência de transfecção desse promotor quando comparado a outros. Indubitavelmente, esse fato deve-se ao tropismo natural do adenovírus e do CMV pelo tecido pulmonar (Xu *et al.*, 1995; Tsan *et al.*, 1996; Yew *et al.*, 1997).

Como vetores para transfecção gênica, os adenovírus possuem uma série de vantagens. Certamente, a mais evidente é que, diferentemente dos retrovírus, os vetores adenovirais podem infectar células totalmente diferenciadas, não replicantes. Somente esse fato potencializa o campo dos vetores de adenovírus. Quando comparados a outros vetores, a transfecção gênica pode ser atingida com alta eficiência. Da mesma forma, quando comparados ao retrovírus, altas concentrações de adenovírus podem ser produzidas em solução. Ademais, vetores adenovirais são estáveis *in vivo* e permitem distribuição direta no tecido de interesse (Boasquevisque *et al.*, 1997; Elkon *et al.*, Harrod *et al.*, 1998; Harrod *et al.*, 2000; Judge *et al.*, 1998; Korst *et al.*, 1995; Otake *et al.*, 1998; Schimd *et al.*, 1997)

Ainda há, no entanto, obstáculos importantes para uma transfecção efetiva e duradoura mediada por adenovírus. Essas barreiras estão diretamente relacionadas com as propriedades do vetor e com a resposta imune do hospedeiro (Byrnes *et al.*, 1995; Ilan *et al.*, 1997; Shaked *et al.*, 1994). A transfecção mediada por adenovírus ocorre de

uma maneira epicromossômica, sem a direta integração nos cromossomos do hospedeiro (Figura 3). Essa propriedade tem o benefício de abrandar o risco de uma mutagênese insercional que ocorre freqüentemente em vetores retrovirais. Entretanto, a transfecção epicromossômica limita a duração da transferência gênica. Como as células não transmitem o seu genoma modificado para as células-filhas, a expressão gênica permanece somente enquanto a célula transfectada é viável. A transfecção gênica *in vivo* induz a uma significativa resposta inflamatória do hospedeiro, podendo se mostrar muito intensa. Essa resposta imune do hospedeiro ao vetor adenoviral e seu produto transgênico são apontados como limitadores da quantidade total e da duração da expressão transgênica (Thomas *et al.*, 2001), assim como prejudica qualquer tentativa de re-transfecção do produto gene-vetor na tentativa de terapia gênica com duração prolongada (Cassivi *et al.*, 2000). Tentativas para evitar a reação imune através da retirada adicional de genes virais no intuito de reduzir a expressão proteica viral pós-transfecção têm se mostrado insatisfatórias (Curiel *et al.*, 1996). Sung & Bromberg (2001) provaram que a transfecção gênica mediada por adenovírus pode ser inibida pela resposta imune inata antiadenovírus induzida por FNT- α e IFN- γ . Worgall e colaboradores (1997 a; 1997 b) também demonstraram que os macrófagos alveolares agem rapidamente na eliminação dos vetores adenovirais. Estratégias para suprimir esse sistema de defesa imune poderiam ser úteis na potencialização da eficácia dos vetores adenovirais na terapia gênica pulmonar.

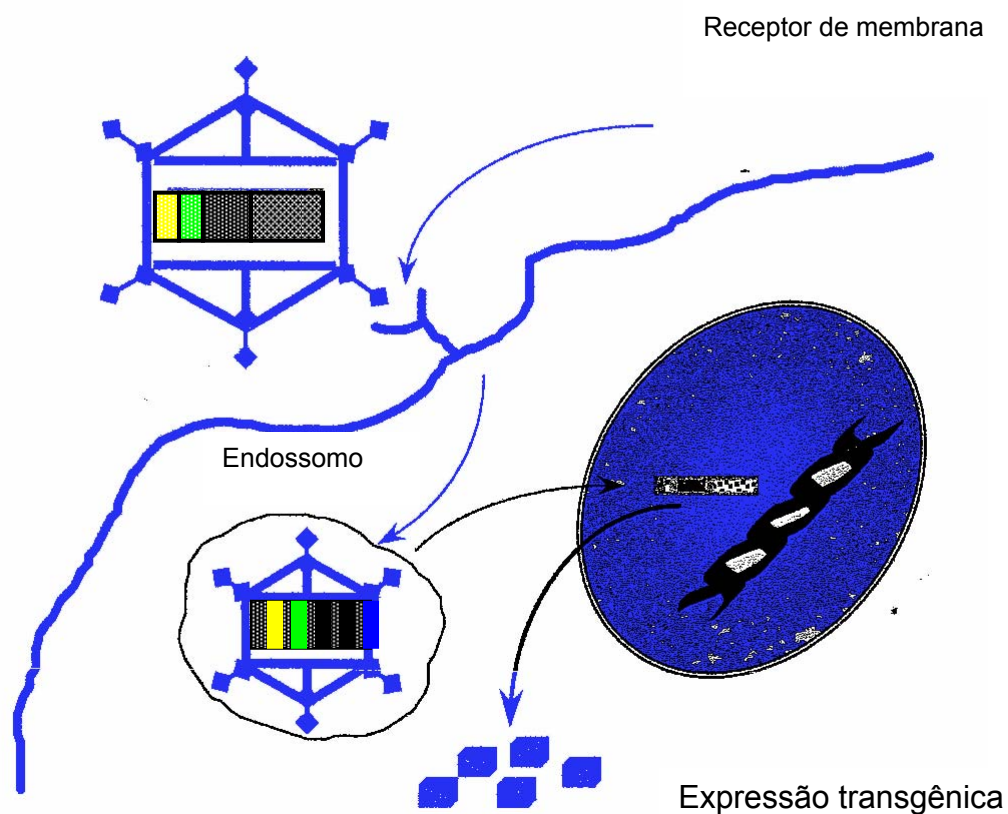


Figura 3 – Mecanismo de transfecção gênica mediada por vetores adenovirais. O vetor adere à célula-alvo através da interação das fibras do adenovírus - base *penton* do receptor de membrana celular específico. Esse produto é movido para o citoplasma – endossomo, onde é quebrado para apresentar seu genoma com o cassete transgênico ao núcleo celular em uma localização epicromossômica. Os componentes nucleares da célula-alvo são usados para a replicação e expressão transgênica.

Estudos com a finalidade de distinguir entre antígenos virais e antígenos relacionados aos produtos transgênicos, em termos de suas contribuições à resposta imune após a transfecção, têm-se mostrado inconclusivos. Curiel e colaboradores (1996)

demonstraram uma relação dose-dependente na inflamação pós-transferência gênica em relação à dose do vetor: altas doses do vetor, na maioria dos casos, estavam inicialmente associadas com maiores índices de expressão transgênica. Porém suas contribuições relativas para indução da resposta imune à transfecção ficaram difíceis de serem distinguidas. Tripathy e co-autores (1996), em uma investigação mais completa desse ponto, demonstraram uma significativa diminuição da resposta imune pós-transfecção, e um concomitante prolongamento da expressão transgênica mensurável, quando a transfecção utilizava proteínas transgênicas próprias (alogênicas) em vez de estranhas (xenogênicas). Houve, no entanto, uma importante contribuição do produto transgênico à resposta imune. O grau de resposta imune devido aos antígenos virais e antígenos relacionados ao produto transfectado depende diretamente da natureza do vetor em questão e do gene transfectado. Uma maneira de se sobrepor a essa resposta imune foi proposta por Addison e co-autores (1997). Em seu trabalho, o uso de promotores murinos ganharia maior eficiência e menor resposta imunológica.

Em 2001, 168 ensaios clínicos foram autorizados pelo *National Institutes of Health (NIH) Working Group on Gene Therapy*, o órgão que aprova qualquer teste clínico envolvendo novos vetores ou novas aplicações terapêuticas (NIH, 2002). Embora alguns destes ensaios clínicos analisem doenças que são indicações de transplante pulmonar, como fibrose cística e deficiência de alfa1-antitripsina, ainda não foi aprovada nenhuma experimentação clínica de terapia gênica humana implicando transplante de pulmão.

OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo são os seguintes:

- 1) Desenvolver uma técnica para transferência gênica terapêutica durante o transplante de pulmão usando um método endoscópico de transferência clinicamente aplicável.
- 2)
 - A) Modificar geneticamente o pulmão doado objetivando melhorar sua capacidade para enfrentar o estresse imposto pelo processo de transplante.
 - B) Explorar o potencial da transferência genética terapêutica de IL-10 humana mediada por adenovírus na isquemia e reperfusão relacionada à injúria aguda do pulmão em um modelo de animal grande.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo

O delineamento da investigação foi o de um estudo tipo experimento clínico randomizado, contemporâneo, dinâmico, onde os desfechos de interesse foram a melhora da função fisiológica pulmonar pós-transplante e a redução da injúria de isquemia-reperusão.

Animais

Porcos machos domésticos Yorkshire (24-41 Kg) foram usados neste estudo. Os animais foram adquiridos de Reimens Fur Ranch, Kitchener, Ontário. Todos os animais receberam os cuidados de acordo com os princípios do cuidado de animal de laboratório formulado pela Sociedade Nacional de Pesquisa Médica, o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publication No.85-23, revised 1985, U.S.Government Printing Office, Washington, D.C. 20402-9325) e o guia para o cuidado e uso de animais de experimentos formulado pelo conselho Canadense de cuidado animal. O comitê de cuidado animal do instituto de pesquisa do Toronto General Hospital aprovou o protocolo experimental.

Fases do estudo

Primeira fase – Otimização da transferência e expressão do hIL-10 em pulmões doadores.

O objetivo da primeira fase foi o de determinar a dose ideal de AdhIL-10 para administração endobrônquica nos pulmões dos porcos doadores antes da retirada do órgão. A dose ideal foi definida como a quantidade suficiente de AdhIL-10 necessária para ser detectada no tecido pulmonar em pg/mg de proteína de hIL-10 através do método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, com comprovação histológica e por imunohistoquímica.

Os seguintes parâmetros foram testados:

- 1) Dose de AdhIL-10 - a dose foi determinada como a mais baixa possível, porém clinicamente eficiente e não causadora de efeitos de toxicidade sistêmica. Foram utilizadas doses 2×10^{10} pfu/ml em dois pulmões até 8×10^{11} pfu/ml em um pulmão somente
- 2) Distribuição da AdhIL-10 em um ou ambos os pulmões por via endoscópica – visto que atualmente a grande maioria das doações é dos dois pulmões, é importante conhecer as repercussões locais e sistêmicas da transfecção gênica;

3) Tempo necessário para uma transfecção detectável – foram testados 6, 12 e 24 horas de intervalo após a distribuição intrapulmonar de AdhIL-10 através de *ELISA*.

Segunda fase – Efeitos da transfecção gênica de AdhIL-10 na função fisiológica pulmonar pós-transplante e na prevenção da injúria de isquemia-reperfusão.

Todos os experimentos desse estudo foram realizados em *duplo-cego*.

Estudo A - Efeito da transfecção gênica hIL-10 na função de enxerto pós-transplante e injúria de isquemia-reperfusão após 12 horas do tempo de transfecção pré-transplante e 18 horas do tempo de isquemia fria (*cold ischemic time*).

Nesta fase, os animais (n=5 por grupo) foram divididos em três grupos. No primeiro grupo, os pulmões doadores foram transfectados com vetor adenoviral (4×10^{10} pfu/ml de Ad5EIRSVhIL-10), que continha gene IL-10 humano (hIL-10); o segundo grupo recebeu o mesmo vetor adenoviral sem a interleucina-10 humana (hIL-10) – vetor “vazio” (VV); e o terceiro grupo foi instilado com solução salina 0.9% (controle). Após 12 horas do tempo de transfecção, os pulmões foram armazenados em solução de preservação com baixo-potássio dextran (SBPD) por 18 horas antes do transplante.

Os porcos doadores e receptores foram equiparados em tamanho ($30.5 \pm 3.7 \text{Kg}$) nos três grupos de estudos. Durante o período de 2h de reperfusão, amostras sanguíneas foram retiradas da linha arterial e analisados os gases sanguíneos a cada 30 minutos. Para medição do pulmão esquerdo transplantado a artéria pulmonar direita foi clampeada (Figura 4); os animais foram mantidos nessa situação por 10 minutos, e então uma análise de gases sanguíneos foi feita. A capacidade de oxigenação do pulmão transplantado foi a medida tomada como padrão-áureo para a avaliação da função de enxerto pulmonar pós-transplante. Essa segunda fase do estudo foi também envolvida em examinar o efeito da transfecção com hIL-10 para o doador *in vivo* na função do pulmão pós-transplantado e alteração dos parâmetros fisiológicos associados com IIR pulmonar, e a relação entre citocinas pró e anti-inflamatórias no plasma e parênquima pulmonar do enxerto, após 2 horas de reperfusão.

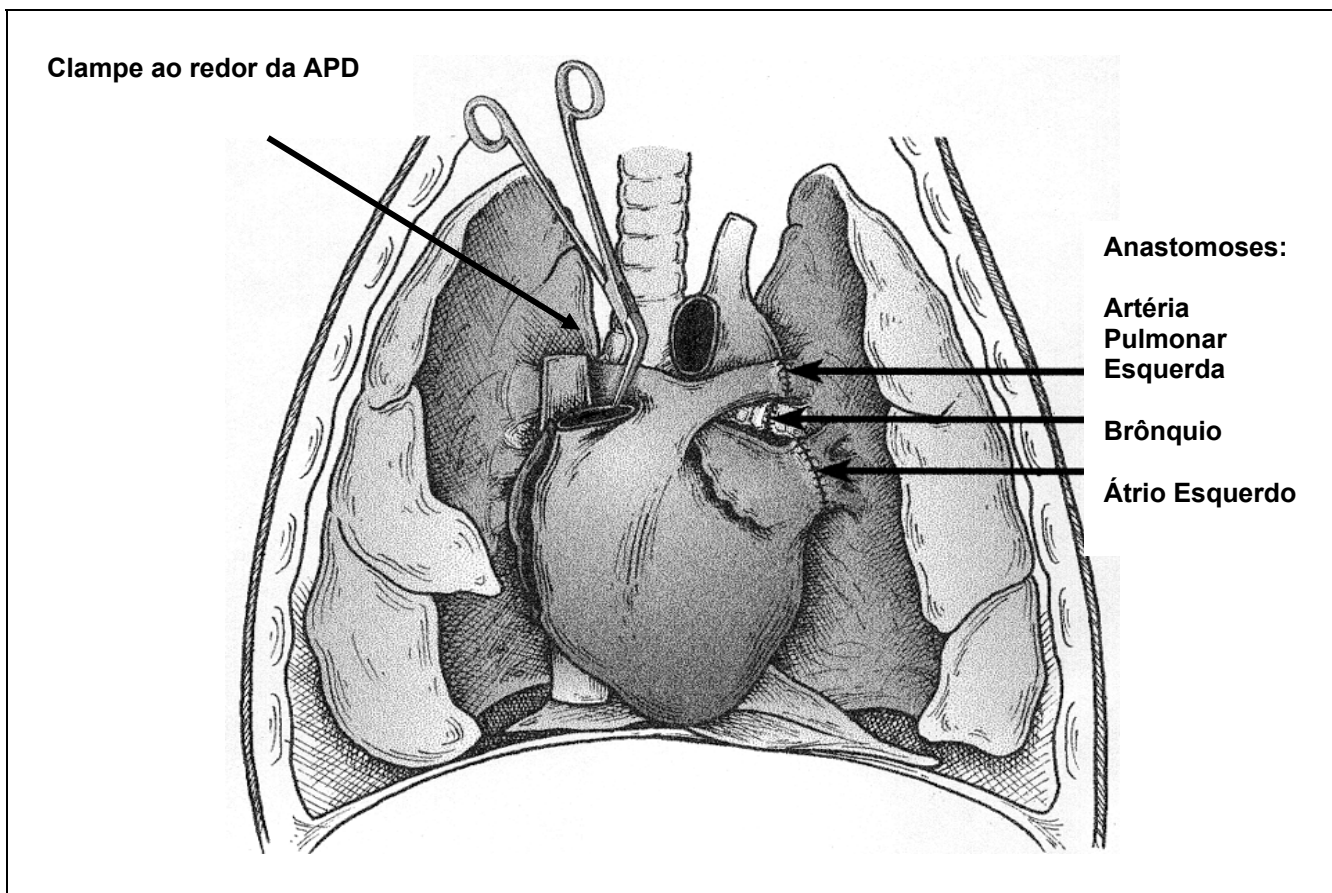


Figura 4 – O modelo de transplante unilateral de pulmão em porcos. O diagrama mostra o clampe vascular posicionado ao redor da artéria pulmonar direita (APD) para análise da função pulmonar esquerda (ilustração gentilmente cedida por A. Pierre, 1998) .

A imunohistoquímica foi realizada para localizar o produto transgênico (hIL-10) nos pulmões, após o processo completo de retirada do órgão-armazenagem-transplante. E, além disso, fornecer informações sobre os tipos de células que contém o hIL-10.

Estudo B - Efeito da transfecção gênica hIL-10 na função de enxerto pós-transplante e a injúria de isquemia-reperfusão após 24 horas do tempo de transfecção e 24 horas do tempo de isquemia fria.

Nessa fase, animais (controle n=3 e AdhIL-10 n=4) foram divididos em dois grupos nos quais os pulmões doadores foram transfectados com vetores adenovirais (4×10^{10} *pfu/ml* do Ad5EIRSVhIL-10), que continha gene IL-10 humano (hIL-10) ou com solução salina 0.9% (controle). Após o tempo de 24 horas de transfecção, os pulmões foram conservados em solução de preservação com baixo-potássio dextran (SBPD) por 24 horas antes do transplante.

Os porcos doadores e receptores foram também adequados quanto ao tamanho. Todas as medidas fisiológicas e análises de citocinas foram feitas com a mesma maneira descrita previamente (Figura 5).

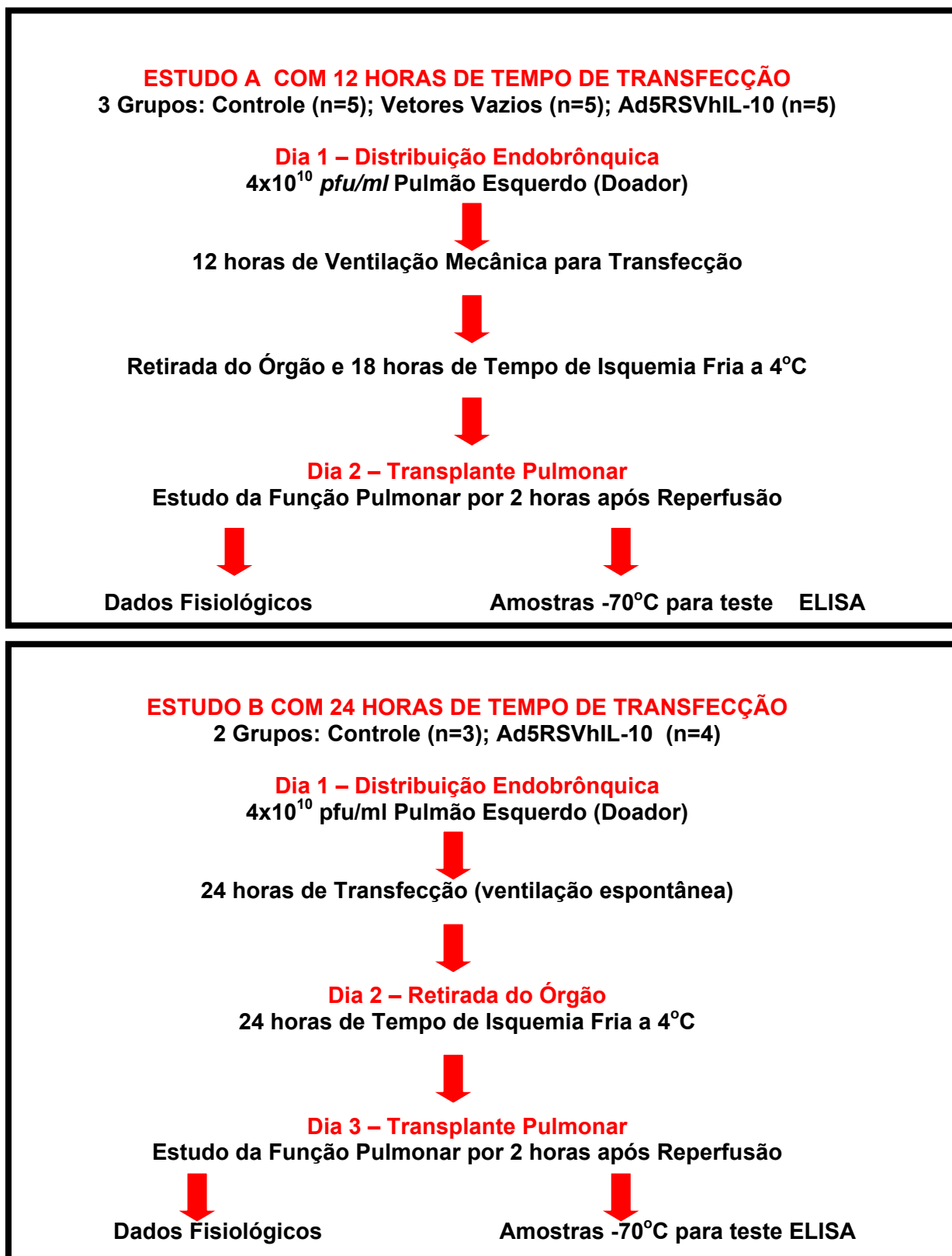


Figura 5 - Distribuição dos grupos nos grupos de estudo na fase II e III

Procedimento de transfeção *in situ*

Todos os porcos receberam 1g de Metilprednisolona sódica intramuscular (IM) (Solu-medrol®, Pharmacia & Upjohn Inc, Mississauga, Ontário) 30 minutos antes da tranfecção. Ketamina (Katalan®, Bimeda-MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontário) 40mg/Kg IM foi administrada antes da anestesia geral. A indução anestésica foi realizada com Pentobarbital Sódico 2.5% (Pentothal®, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontário) 5mg/Kg intravenoso (IV). No estudo A foi realizada traqueostomia, sendo introduzido um tubo endotraqueal com tamanho apropriado, e conectado a um ventilador de volume-controlado (Servo Ventilator, Siemens-Elema Ab, Sweden). Propofol (Diprivan®, Novopharm Limited, Toronto, Ontário) 5 mg/Kg/hora IV e Citrato de Fentanyl (Fentanyl Citrate®, Abbott Laboratories Limited, Toronto, Ontário) 25 µg/Kg/hora IV foram os agentes anestésicos. A ventilação mecânica foi instalada com FiO₂ 100% na primeira hora e 40% subseqüentemente. O ciclo respiratório foi colocado em 16-18 mpm, e o volume corrente em 10 ml/Kg. O agente bloqueador neuromuscular foi Brometo de Pancuronium (Pancuronium Bromide®, Sabex Inc, Boucherville, QC) 100µg/kg IV (Figura 6).

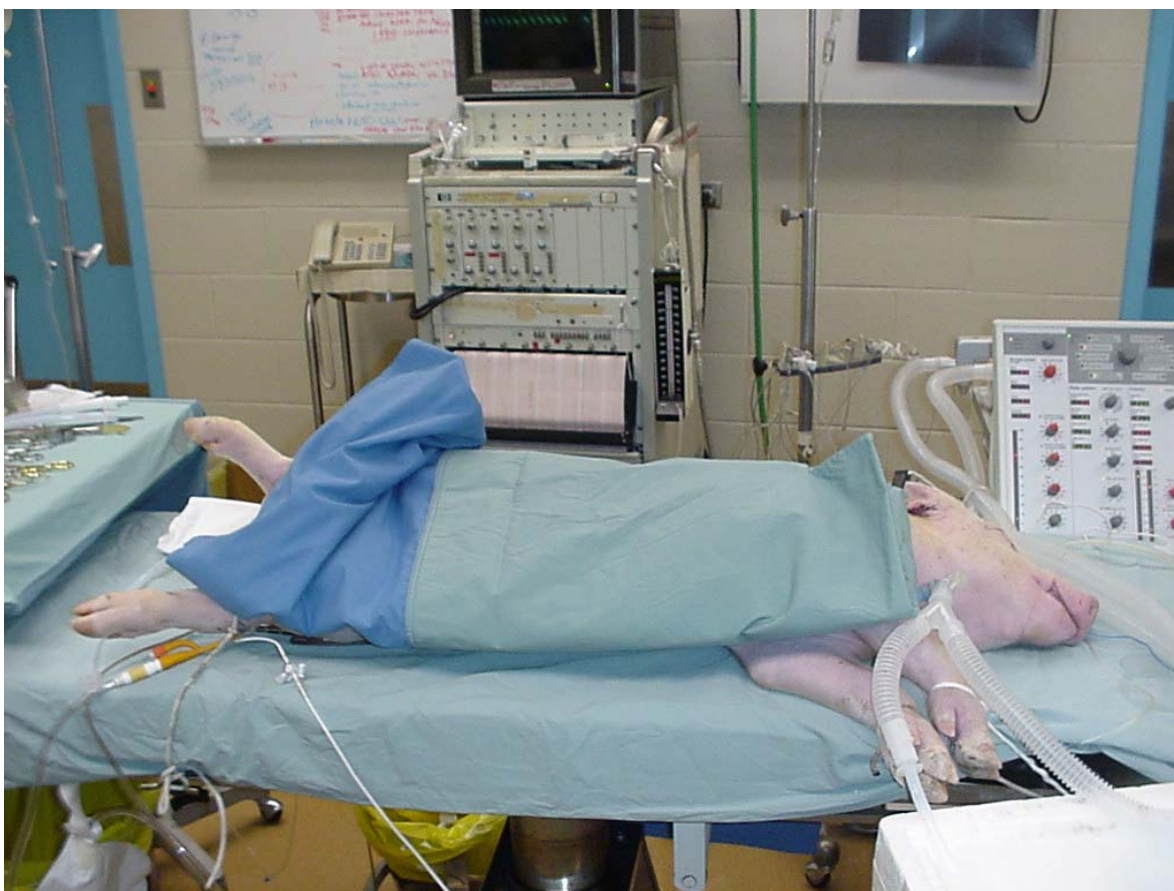


Figura 6 – Procedimento de transfecção *in situ*. O animal, após a transfecção, foi mantido em ventilação mecânica por 12 horas.

O estudo B iniciou do mesmo modo que o A. Contudo a anestesia geral foi mantida com Propofol (Diprivan®, Novopharm Limited, Toronto, Ontário) 5 mg/Kg/hora IV. Após a administração endobrônquica, uma respiração espontânea foi obtida. Até a recuperação completa, todos os animais foram mantidos em ventilação mecânica com FiO_2 21%. A ciclo respiratório foi colocado em 16-18 mpm e o volume corrente 10 ml/Kg. Durante essas 24 horas de transfecção, todos os porcos foram mantidos em cativeiro. Comida e água foram fornecidos *ad libitum*.

Para transferência endobrônquica, um broncoscópio flexível adulto de fibra

óptica (Olympus R BF Type I T 20, Japan) foi inserido através do tubo endotraqueal. O AdhIL-10 ou vetor vazio foram diluídos em 4 ml de solução salina. O cateter foi inserido dentro dos brônquios segmentares do pulmão esquerdo e 1 ml de solução foi injetada em cada brônquio segmentar, seguida por 3-4 ml de solução salina para limpar o cateter. Um total de 24 ml de líquido foi injetado dentro do pulmão esquerdo (Figura 7).



Figura 7 – Método usado para distribuição endobrônquica com um broncoscópio flexível adulto de fibra óptica (Olympus R BF Type I T 20, Japan). Observa-se a técnica endoscópica e o material utilizado para distribuição endobrônquica no pulmão esquerdo do animal doador.

Procedimento com os doadores

No dia da operação, os porcos doadores foram randomizados da seguinte forma: grupo controle, grupo vetor vazio ou grupo AdhIL-10. Todos os membros da

equipe cirúrgica foram cegados em todo o processo de seleção.

Os porcos doadores no estudo A foram sedados com Ketamina (Katalan®, *Bimeda-MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario*) 40mg/Kg IM, anestesiados com Pentobarbital Sódico 2.5% (Pentothal®, *MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario*) 6-8 mg/Kg IV e mantidos com Propofol (Diprivan®, *Novopharm Limited, Toronto Ontario*) 5 mg/Kg/hora IV e Citrato de Fentanyl (Fentanyl Citrate®, *Abbott Laboratories Limited, Toronto, Ontario*) 25 microg/Kg/hora IV. Uma traqueotomia cervical com uma introdução de tubo # 8.0 (Portex®, *Sims, Markham, Ontario*) foi realizada, e os animais foram ventilados com ventilação intermitente pressão-positiva (Servo Ventilator 300, *Siemens-Elema Ab, Sweden*). O ciclo respiratório foi colocado em 16-18 mpm, e o volume corrente em 10 ml/Kg. Inicialmente a FiO₂ foi mantido em 40%. Após, a FiO₂ foi aumentada para 100% e mantida durante o *flush* da artéria pulmonar com uma pressão expiratória final positiva de 5 cmH₂O. Uma esternotomia mediana foi realizada, o pericárdio aberto, o timo foi removido e as veias cavas superior e inferior foram circundadas com fita de seda. Após a heparinização sistêmica por via intravenosa Heparina Sódica (Hepalean®, *Leo Pharma Inc, Ajax, Ontario*), uma cânula de tamanho 21 *French* foi introduzida no tronco da artéria pulmonar (AP) através de uma sutura em bolsa com Prolene® 4-0 (Ethicon, *Peterborough, Ontario*). Depois da introdução dessa cânula, 500 µg de Prostaglandina E1 (Alprostadil® *Pharmacia & Upjohn Inc, Mississauga, Ontario*) foram injetados na AP. Seguindo a injeção de Prostaglandina E1 na artéria pulmonar, esperou-se a queda da pressão arterial sistêmica em 30% para oclusão total das veias cavas e a transecção da aurícula do átrio esquerdo do coração. A AP foi irrigada com 60 ml/Kg de solução de preservação baixo-potássio Dextran (Perfadex®, *Biophausia, Uppsala, Sweden*) a 4° C de uma altura de 30 cm

acima do coração (Figura 8). A ventilação foi mantida o tempo todo da extração do bloco coração-pulmão. Para minimizar a atelectasia, uma pressão positiva no sistema de ventilação de aproximadamente 25 cmH₂O foi aplicada por 20 segundos. A traquéia foi clampeada com os pulmões inflados com 100% de oxigênio. Os cuidados foram tomados no sentido de não hiperinsuflar os pulmões, já que o pulmão do porco parece propenso para formação de bolhas subpleurais e ruptura. Por esta razão, os pulmões foram inflados com uma pressão intratraqueal de 20-25 cmH₂O no máximo. Após a retirada do bloco coração-pulmão, uma lavagem retrógrada com SPBD, através da aurícula esquerda do coração, foi realizada. O bloco coração-pulmão foi então colocado em um saco plástico contendo 500 ml de SBPD, duplamente ensacada, e então armazenada a 4° C por 18 horas em uma sala refrigerada (*Constant Temperature Control Ltd, Weston, Ontario*). A sala foi monitorada por um aparelho marcador de temperatura (*Series AR100 Recorder Controller, Honeywell, Minneapolis, Minnesota*) para confirmar as condições de confiabilidade do armazenamento. Todos os pulmões continuaram bem inflados por mais de 18 ou 24 horas do período de armazenamento.

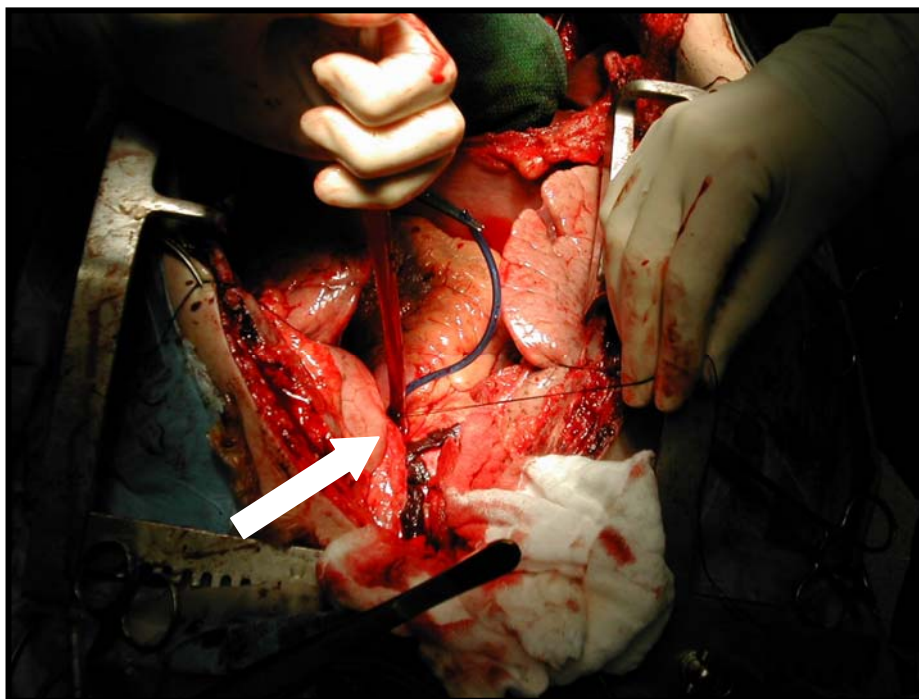


Figura 8 – Procedimento realizado no porco doador: esternotomia mediana com abertura do pericárdio, as veias cavas superior e inferior foram circundadas com fita de seda (não visualizado); heparinização sistêmica e cânula de tamanho 21 *French* foi introduzida no tronco da artéria pulmonar (AP) através de uma sutura em bolsa (seta). Após a introdução desta cânula, 500 µg de Prostaglandina E1 foi injetada na AP.

Procedimento com os receptores

Os porcos receptores foram sedados e anestesiados com o mesmo procedimento usado nos animais doadores. Um tubo endotraqueal com um bloqueador bronquial (*Univent® tube, Phycon-Fuji Systems Corp, Tokyo, Japan*) foi introduzido através de uma traqueostomia. Seguindo a indução anestésica, Metilprednisolona (*Solumedrol®*) 1g IV foi administrada. Cateteres intravenosos foram inseridos nos ramos da artéria e veia femoral direita, assim como um cateter termodinâmico pulmonar

(*Swan-Ganz®*, *American Edwards Laboratoris*, *Añasco*, *Puerto Rico*) na veia jugular interna esquerda após exposição cirúrgica. A linha arterial e o cateter termodinâmico pulmonar foram conectados a um transdutor de pressões *Hewlett Packard* modelo 1290 A (*Hewlett Packard*, *Mississauga*, *Ontario*) usando-se linhas de controle de pressão (6', 0459206, *Cobe*, *Lakewood*, *Colorado*). A pressão arterial e a pressão da artéria pulmonar foram continuamente controladas com um monitor de multicanais *Hewlett Packard* modelo 7758 A (*Hewlett Packard*, *Mississauga*, *Ontario*) após a calibração, utilizando-se um esfigmomanômetro de mercúrio. Ringer Lactato e NaCl 0.9%, foram usados para reposição de volume. Uma toracotomia foi realizada através do quarto espaço intercostal esquerdo. Ambas as artérias pulmonares esquerda e direita foram cuidadosamente dissecadas para evitar lesão nos nervos vagos ou frênico. A artéria pulmonar direita foi circundada com uma fita umbilical contígua ao primeiro ramo do lobo superior direito. Heparina Sódica (3000 UI) foi então administrada IV seguida por 1000 UI/hora por 2 horas. Essa dose de Heparina foi determinada de experimentos anteriores no laboratório para manter o tempo de coagulação ativada acima de 400 segundos durante o período de operação e avaliação fisiológica (Pierre *et al.*, 1998). Sulfato de protamina não foi usado para reverter a ação da heparina no fim da operação. O hilo pulmonar foi dissecado e a veia ázigos esquerda foi cuidadosamente separada da aurícula esquerda e ligada. O ligamento pulmonar inferior foi desfeito, e então as veias pulmonares ligadas. Um pequeno clampe vascular DeBakey® foi colocado próximo à origem da artéria pulmonar esquerda, sendo esse vaso seccionado junto ao primeiro ramo (segmento ápico-posterior). As veias pulmonares esquerdas já dissecadas foram ligadas no pulmão o mais distal possível. Por último, o brônquio foi dissecado e o balonete do tubo endotraqueal inflado para obstruir o brônquio esquerdo. O volume corrente foi reduzido para 5-8 ml/Kg e os ciclos respiratórios ajustados para manter o

PCO₂ entre 35-40 mmHg e o PO₂ acima de 95 mmHg (*Ciba-Corning blood gás system model 278, Ciba-Corning, Markham, Ontario*). O pulmão esquerdo do doador foi então isolado na mesa auxiliar e um *cuff* de átrio esquerdo foi formado para incluir duas veias pulmonares. Seguindo esses passos, o brônquio do receptor foi preparado com um tamanho apropriado. O bloqueador brônquico foi inserido no brônquio principal esquerdo aberto e o balão inflado para possibilitar a ventilação do pulmão direito individualmente. A anastomose foi realizada primeiro como dois fios cirúrgicos 4-0 vicryl® (*Ethicon, Peterborough, Ontario*) como suturas de ancoragem em cada ângulo da parede membranosa posterior do brônquio; uma sutura contínua com 4-0 prolene® (*Ethicon Peterborough, Ontario*) na porção membranosa e uma sutura com pontos separados nos dois terços anteriores do brônquio foi realizada de forma a criar uma telescopagem do brônquio do doador no do receptor. A anastomose da AP foi o seguinte passo com uma sutura de ininterrupta com 6-0 prolene® (*Ethicon Peterborough, Ontario*) ancorada em dois pontos. Finalmente, a sutura do *cuff* das veias pulmonares foi feita com pontos evertidos usando-se 5-0 prolene® (*Ethicon Peterborough, Ontario*), assegurando-se uma justaposição íntima-íntima na anastomose da aurícula esquerda do coração (Figura 9). Após a reinsuflação do pulmão, o clampe da AP foi removido gradualmente e o ar intravascular do pulmão removido através da anastomose atrial esquerda. Os pulmões foram então ventilados com 100% de oxigênio, 5 cmH₂O PEEP, e uma ventilação média por minuto para manter uma PaCO₂ normal. O pulmão esquerdo foi aspirado, usando-se um broncoscópio e a integridade da anastomose brônquica foi avaliada. Manteve-se uma pressão sustentada nas vias aéreas menor que 30 cmH₂O, empregada para remover atelectasia.

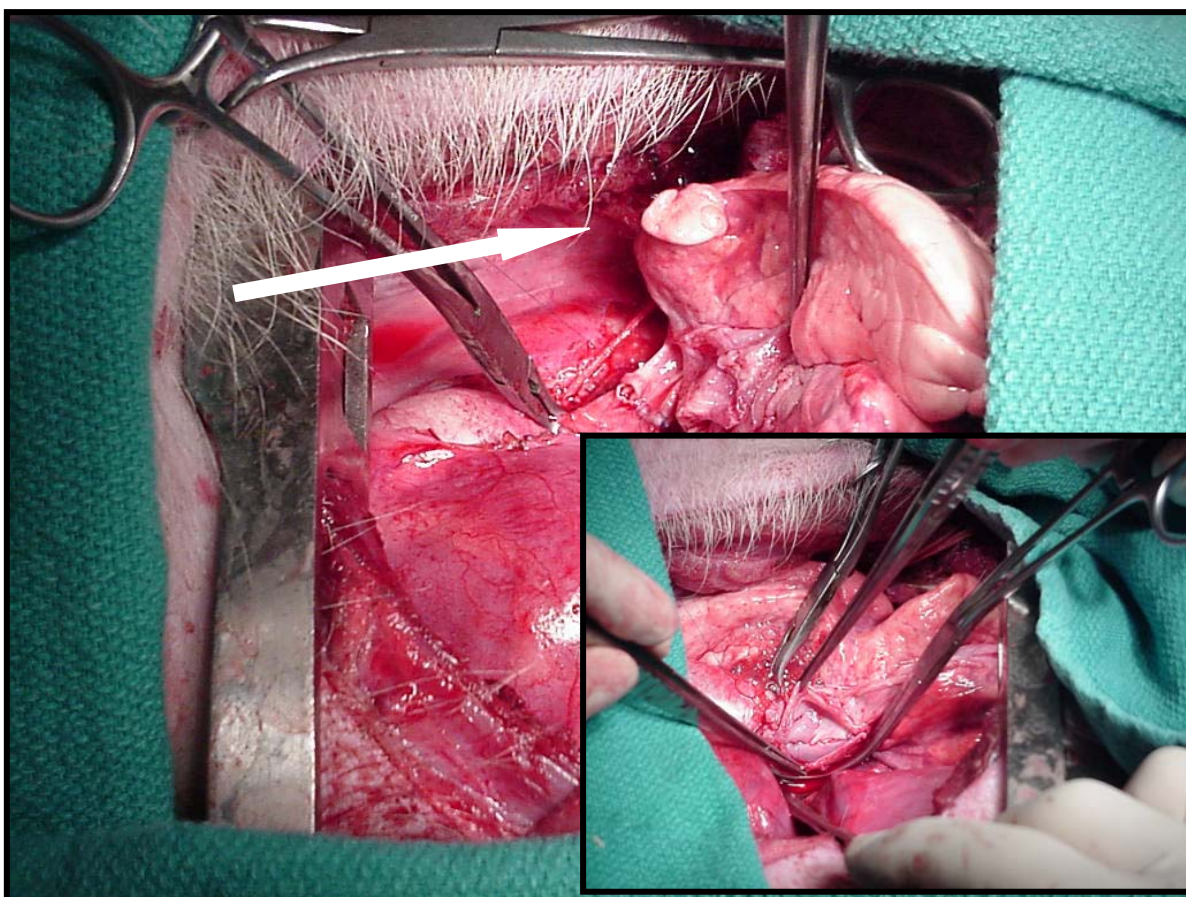


Figura 9 – Na etapa de implante do enxerto no receptor, as anastomoses foram realizadas obedecendo à seguinte ordem: brônquio principal esquerdo, artéria pulmonar (seta) e átrio esquerdo. No detalhe, o aspecto da anastomose íntima-íntima no átrio esquerdo.

Geração da recombinação do adenovírus manifestando IL-10 humana

Vetores adenovirais (serotipo 5) contendo o gene humano IL-10 com um promotor *Rous Sarcoma Virus* (RSV) (Ad5E1RSVhIL-10) e vetores vazios (Ad5BGL2)

foram construídos pelo *Gene Transfer Vector Core of the University of Iowa College of Medicine (Iowa City, Iowa)*. O adenovírus hIL-10 construído foi reportado como AdhIL-10 e o vetor vazio Ad5BGL2

O cRNA de IL-10 humana foi obtido pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com iniciadores de amplificação 5' e 3' (5'-hIL-10*Bam*HI, 5'-C G C G G A T C C C A T G C A C A G C T - C A G C A C T G - 3'; 3'-hIL-10*Bam*HI, 5'-C G C G G A T C C G C C A C C C T G A T G T C T C A G T - 3'), usando-se o clone pSR α hIL-10 como modelo (gentilmente fornecido por E. Field, *University of Iowa*). O produto de PCR foi clonado por restrição Bam HI dos sítios terminais e adicionando-se seqüência de oligonucleotídeos, em uma seqüência de plasmídeos (pAdRSV4); essa seqüência plasmídica contém o promotor *Rous Sarcoma Virus*, o vírus símio 40 (SV-40)-poly(A) como sinal e a seqüência adenoviral genômica de 0 a 1 e 9 a 16 das unidades do mapa do adenovírus humano tipo 5. A recombinação de adenovírus manifestando IL-10 foi gerada por recombinação homóloga entre pAdRSVhIL-10 e adenovírus humano serotipo 5 derivado dl309, usando-se método-padrão (Gudmundsson *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2000). AdBGL2 tem a mesma coluna principal viral como o AdRSVhIL-10.

Medidas da função do enxerto de pulmão

A função de enxerto foi avaliada pelas análises completas dos gases arteriais (GA) colhidos antes da reperfusão, durante o tempo de isquemia quente (ou *warm ischemic time*). Após a reperfusão, GA foram verificados na linha arterial sistêmica aos 10, 30, 60, 120. Aos trinta minutos da reperfusão realizou-se a avaliação pulmonar

esquerda, fechando-se a artéria pulmonar contralateral com um clampe vascular por 10 minutos (Figura 2), sendo os gases sanguíneos arteriais foram retirados da linha femoral e medidos em um sistema de análise de gases sanguíneos Ciba-Corning modelo 278 (*Ciba-Corning Markhan, Ontario*). Esta avaliação foi repetida aos 60, 90 e 120 minutos. A pressão arterial pulmonar, pressão atrial esquerda e débito cardíaco foram obtidos usando-se um termo-cateter Swan- Ganz® introduzido na veia jugular interna esquerda. Todos os porcos foram capazes de suportar um clampeamento da AP direita com perfusão do pulmão esquerdo nativo anteriormente a pneumonectomia esquerda sem complicações ou necessidades de drogas. Uma infusão de Norepinefrina (*Norepinephrine Bitartrate®, Sabex Inc, Boucherville, QC*) na escala variável de 0.07-1 mg/ml/h foi usada durante a avaliação do pulmão transplantado, com o intuito de manter uma pressão sanguínea sistólica acima de 80 mmHg.

O pico de pressão das vias aéreas (PPVA) foi medido após a indução anestésica e durante todo o procedimento cirúrgico. A elastância pulmonar (EP) foi avaliada após 2 horas da reperfusão; os porcos foram mudados de posição: decúbito lateral direito para o decúbito supino. A toracotomia esquerda foi prolongada para o lado direito (incisão *clam-shell*). O hilo direito foi dissecado e os brônquios para o lobo superior direito e intermediário foram clampeados.

A razão peso úmido-seco do tecido pulmonar foi determinada logo após as 2 horas de reperfusão, sendo então colocado esse tecido em um forno seco a 85°C por 24 horas. Após tal procedimento de secagem, a amostra foi repesada, e a proporção do peso do pulmão antes e após a secagem foi calculada. Essa medida reflete edema pulmonar pós-reperfusão.

Amostras de tecido e plasma

Amostras do pulmão esquerdo foram usadas para a razão peso úmido-seco (lobo inferior). Outras amostras foram fixadas em formalina 10% e embebidas em parafina para imunohistoquímica (todos os lobos), e análises de citocinas (todos os lobos). Para detecção de citocinas no plasma, 6 ml de sangue foram retirados de hora em hora do receptor. Também, 6 ml de sangue foram retirados antes da reperfusão do pulmão transplantado, em 10 minutos, 60 minutos e 120 minutos após a reperfusão. O sangue foi centrifugado a 5000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos e o plasma foi imediatamente armazenado a -70°C .

Preparação do tecido e *ELISA* para citocinas

Testes de *ELISA* foram efetuados no plasma doador e receptor e em sobrenadantes do tecido homogeneizado porcino: FNT- α porcino, IFN- γ porcino, IL-10 porcino, IL-8 porcino, IL-6 porcino, IL-2 porcino e IL-10 humano foram mensurados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C . Os tecidos, visando sua proteção de lise celular, foram homogeneizados e incubados a 4°C em tampão contendo 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.6% octilfenoxi-polietoxi-etanol (Nonidet P-40), 0.5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), Aporotina e Leupeptina (Gilbert & Johnson, 1994). Os tecidos homogeneizados foram então sonificados e centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram analisados em duplicata para proteínas totais.

Para FNT- α , IFN- γ , IL-10, IL-8, e IL-2 porcos foram usados Cytoscreen® imuno-teste (*Biosource Internacional, Camarillo, CA*). A IL-10 humana e a IL-6 suína foram detectadas com equipamento de imuno-testes Quantikine® (*R&D Systems Minneapolis, MN*). A densidade óptica de cada uma destes testes foi verificada a 450 e 540 nm em um leitor de micro-placas NM-600 (*Dynatech Laboratories, Chantilly, VA*). O conteúdo da proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976). O kit IL-10 humano não apresentou reação cruzada com o IL-10 endógena nos pulmões dos porcos, e vice-versa.

Imunohistoquímica para a IL-10 humana

Todas as secções, incluindo as lâminas de controle negativas, foram tratadas antes da aplicação dos anticorpos primários com uma proteína bloqueadora para peroxidase endógena e biotina. Após uma breve lavagem em solução salino-fosfato tamponada-albumina sérica bovina (PBS-BSA) O anticorpo policlonal primário específico caprino foi aplicado a uma diluição 1: 50. As lâminas de controle negativo foram preparadas por dois métodos: (1) o anticorpo primário foi excluído e recolocado por PBS-BSA, e (2) o anticorpo primário foi omitido e substituído por soro de controle caprino não imunizado. Todas as lâminas foram incubadas durante a noite a 4°C.

O procedimento de detecção foi realizado com o equipamento *Elite Vector Stain ABC system* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA*), como recomendado pelo fabricante. A visualização colorimétrica foi realizada usando-se 3,3' -diaminobenzidina (DAB) como o substrato cromogênico (*Sigma, St Louis, MO*). A coloração utilizada para detalhes nucleares foi hematoxilina-eosina.

Análise estatística

Os dados quantitativos foram descritos pela média e desvio padrão. Comparações entre grupos independentes foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de um critério de classificação (ANOVA ONEWAY). A localização de diferenças seguiu o procedimento de *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls* e *Fischer*. Na situação de observações emparelhadas, utilizamos a o teste de ANOVA de medidas repetidas com subsequente localização de diferenças com novamente procedimento de *Student-Newman-Keuls*. A comparação de variáveis preditivas e de desfecho, ambas com nível de mensuração contínuo (variáveis quantitativas), foi realizada com análise de regressão linear. Situações específicas envolvendo a situação de comparação somente entre dois grupos foram baseadas no teste T de *Student*. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0.05$. Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Microsoft Excel® 2000, StatView® versão 5.0.1 (*SAS Institute Inc., Cary, NC*).

RESULTADOS

Todos os animais doadores toleraram a estratégia de transferência genética sem incidente e permaneceram estáveis hemodinamicamente durante todo o período de observação.

Fase de estudo I- Análise seqüencial da transferência gênica endobrônquica mediada por AdhIL-10 para pulmões *in vivo*.

Expressão dose-dependente da hIL-10 em pulmões doados *in vivo*

Uma das questões importantes para transferência genética em animais maiores é a dose. Não se pode diretamente extrapolar as doses usadas por animais pequenos em modelos de grandes animais usando-se tão somente o peso corporal. Nesta fase I do estudo, foram testadas diferentes doses de AdhIL-10 em pulmões de porcos doadores por 12 horas de transfecção, um período razoável para um doador, em uma situação clínica real, ser identificado e para que todo processo estrutural de uma retirada de multiórgãos, planejada. Doses mais baixas do que 4×10^{10} *pfu/ml* de AdhIL-10 em ambos os pulmões não deram quantia mensurável de hIL-10 em tecidos pulmonares. Quando a transfecção foi feita com 4×10^{10} *pfu/ml* de AdhIL-10 somente no pulmão esquerdo por 12 ou 24 horas, um significativo aumento dos níveis de expressão de AdhIL-10 foi detectado (Figura 10A)(35.2 ± 13.4 , e 100.1 ± 7.7 , respectivamente; $p \leq 0.003$). Não foi observada diferença significativa na expressão de AdhIL-10, entre os diferentes lobos pulmonares de um mesmo animal, indicando uma consistente distribuição de gene no pulmão (figura 10B).

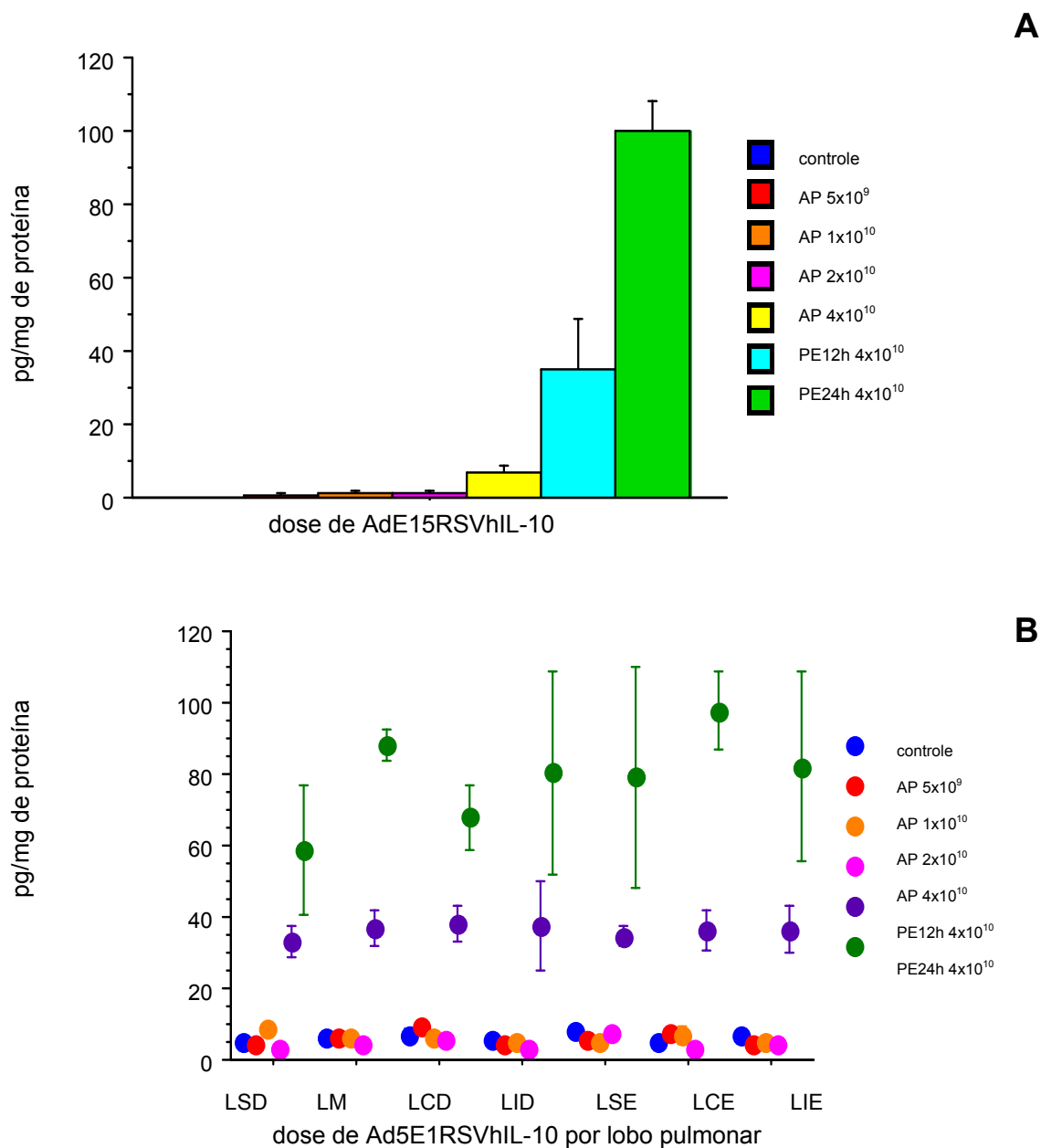
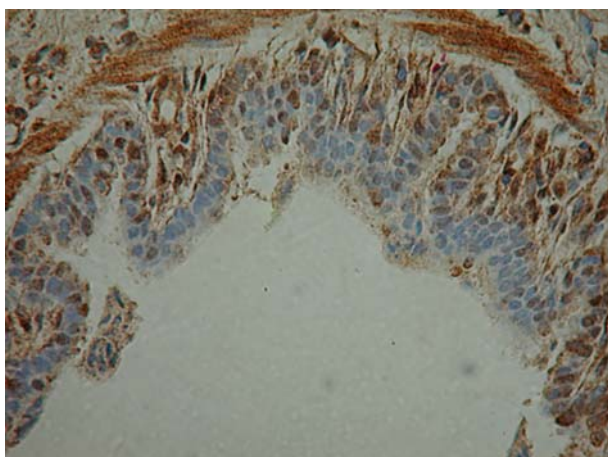
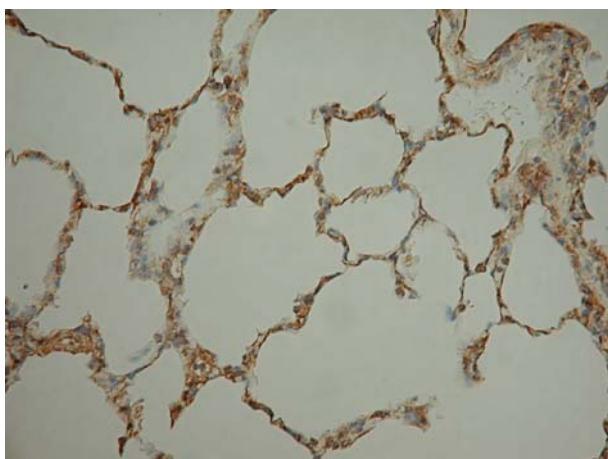
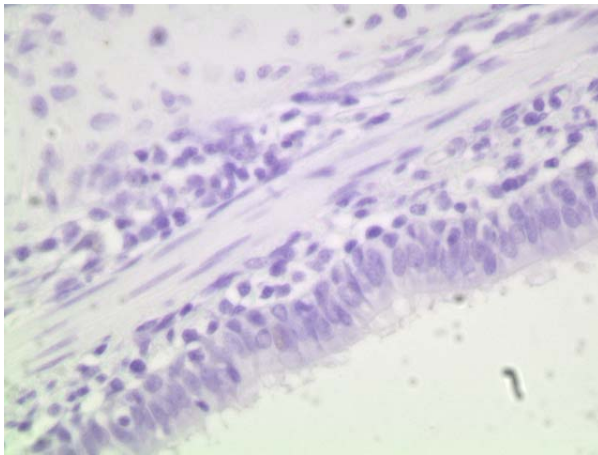


Figura 10 – Expressão de hIL-10 em pulmões de porco depois de diversas doses em transfecção *in vivo*.

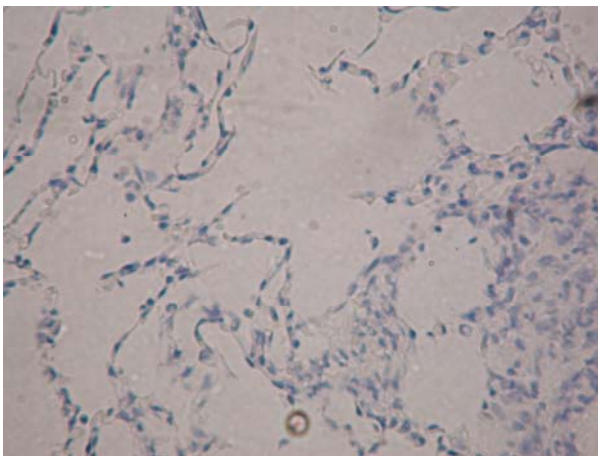
(A). Níveis de hIL-10 em tecido pulmonar homogeneizado depois de períodos diferentes de transfecção endobrônquica em pulmões de porcos (n=14). Os níveis começam a ser estatisticamente significativos após 4×10^{10} pfu/ml de AdhIL-10 no pulmão esquerdo apenas em 12 e 24 horas ($p \leq 0.003$). (B) Níveis de hIL-10 por lobo pulmonar após transfecção *in vivo* ($p = 0.001$). Abreviações: AP ambos pulmões; PE pulmão esquerdo; LSD lobo superior direito; LM lobo médio; LCD lobo caudal direito; LID lobo inferior direito; LSE lobo superior esquerdo; LCE lobo cardíaco esquerdo; LIE lobo inferior esquerdo.

A imunohistoquímica demonstrou expressão transgênica em grandes e pequenas vias aéreas dos pulmões transfectados com hIL-10, com uma coloração marrom espalhada em todo o revestimento epitelial (figura 11A) e também no nível alveolar. Uma maior ampliação (figura 11B) revelou que em pequenas vias aéreas havia claramente hIL-10 expresso. Células intersticiais e macrófagos alveolares também manifestaram positividade para hIL-10, como observado pelo imunopatologista. Este estudo demonstrou transfecção e expressão gênica adequados de hIL-10 nos pulmões após 12 horas de transfecção de doador *in vivo*. Não houve visualização de positividade na imunohistoquímica nos controles com o anticorpo primário omitido e substituído por *PBS-BSA* (figuras 11C e 11D).

**A****B**



C



D

Figura 11 - Detecção de hIL-10 através de imunohistoquímica em tecido pulmonar pós-transplante. A coloração para hIL-10 (marrom) está demonstrada nas células epiteliais de grandes vias aéreas (A) e alvéolos (B). Exemplos de controles negativos para grandes e pequenas vias aéreas sem o anticorpo específico para hIL-10 podem ser visualizado em (C) e (D).

Fase de estudo II - Efeito da transferência gênica endobrônquica mediada por adenovírus hIL-10 *in vivo* em alotransplante em grandes animais.

A transferência genética hIL-10 melhora a função do enxerto de pulmão pós-transplante.

Os níveis médios de PaO₂ no sangue arterial dos doadores em 12 horas do tempo de transfecção nos grupos de estudo A foram em mmHg: 200.2±14.6; 197.8±5.8; e 188.1±13.8 controle, vetores vazios e AdhIL-10, respectivamente ($p>0.05$). Todos os grupos mantiveram uma ventilação mecânica com um FiO₂ de 40%, procurando-se,

assim, evitar toxicidade do oxigênio no parênquima pulmonar. Os níveis de PaO₂ dos doadores não foram significativamente diferentes entre os grupos de estudos individuais (Figura 12).

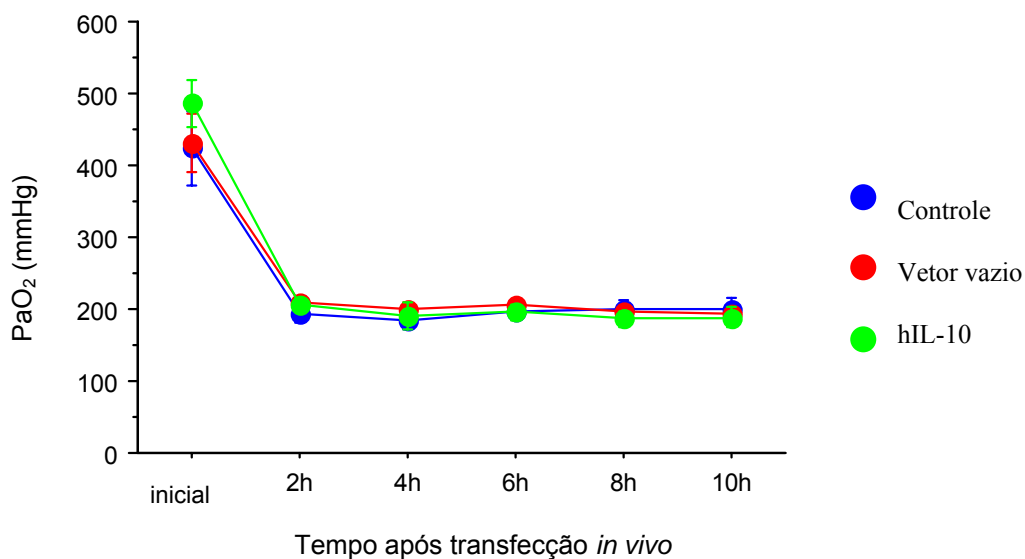


Figura 12 – Níveis de PaO₂ arterial após distribuição endobrônquica de Ad5E1RSVhIL-10. Note-se que os níveis iniciais correspondem ao período em que o animal foi ventilado com FiO₂ de 100%. Logo após, a saturação foi reduzida para 40% e mantida por 12 horas.

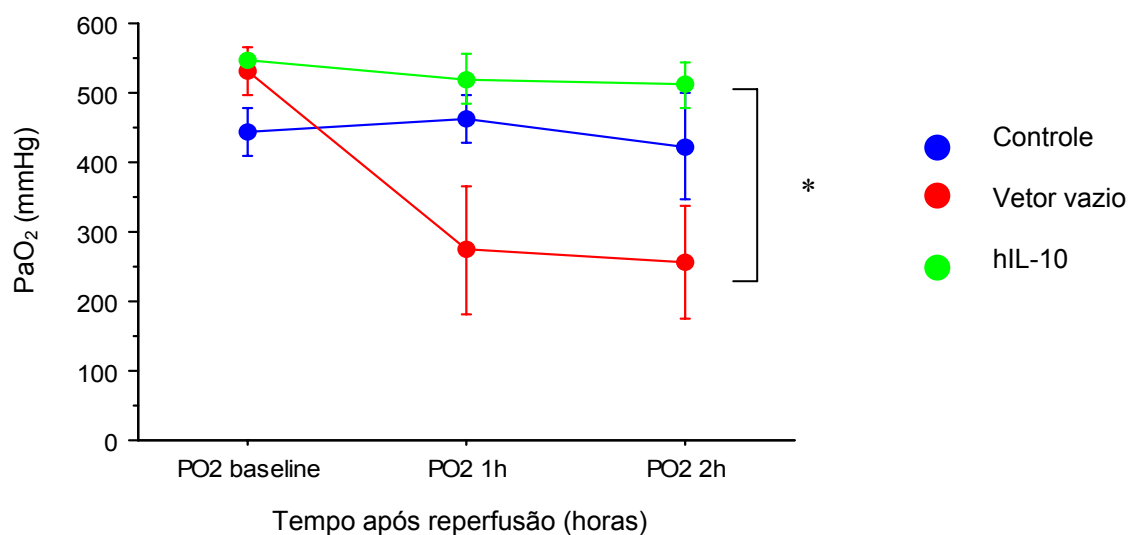


Figura 13 – Níveis de PaO₂ arterial após reperusão do pulmão esquerdo transplantado. Período de transfecção gênica 12 horas; tempo de isquemia fria 18 horas. * $p < 0.05$.

O pico de pressão nas vias aéreas (PPVA) é estritamente relacionado com a severidade do dano alveolar e intersticial. A PPVA é uma medida confiável do edema do pulmão durante os períodos de ventilação pós-transplantes e reperfusão. As mais baixas medidas na PPVA durante o período de reperfusão nos três grupos no estudo A foram vistos nos pulmões com AdhIL-10 comparados com os vetores vazios e controles (24.8 ± 0.8 ; 30.4 ± 1.6 ; 37.3 ± 3.1 , AdhIL-10, vetores vazios e controle, respectivamente, $p < 0.05$) (Tabela 4).

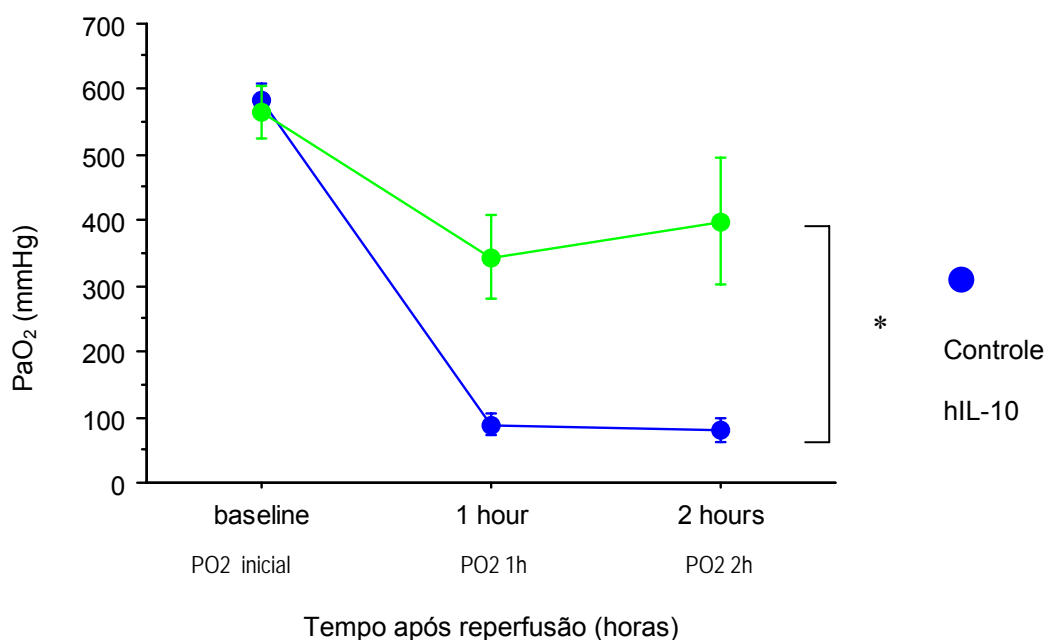


Figura 14 – Níveis de PaO₂ arterial após reperfusão do pulmão esquerdo transplantado. Período de transfecção gênica 24 horas; tempo de isquemia fria 24 horas $p < 0.05$.

O edema pulmonar com o tempo de 24 horas de transfecção e 24 horas de armazenamento foi também significativamente menor nos pulmões com AdhIL-10 do que os pulmões controles (6.1 ± 4 ; 10.1 ± 0.8 ; AdhIL-10 e controle, respectivamente, $p < 0.05$). Também percebeu-se que a razão de peso úmido-seco em AdhIL-10 –12h (Estudo A) e AdhIL-10 –24h (Estudo B) os pulmões não diferiram significativamente de cada um dos outros, repetindo os mesmos resultados prévios em modelos de roedores

(Fischer *et al.*,2001) (Tabela 4). No grupo de transfecção 24 horas, novamente a AdhIL-10 teve resultados mais baixos de PPVA do que nos controles (24.5 ± 4.9 ; 32 ± 8.4 , AdhIL-10 e controle, respectivamente $p<0.03$). Percebeu-se que a razão de peso úmido-seco tecidual pulmonar aumentou consideravelmente após o prolongamento do tempo de isquemia fria. Esse achado corrobora com o fato de que a injúria induzida fora mesmo de maior intensidade.

Tabela 4 – Medidas dos parâmetros fisiológicos após transfecção gênica de Ad5E1RSVhIL-10

	PaO₂ Média	U/S Média	PPVA Média
Grupo	(mmHg)		(cmH₂O)
IL-10 12h	511±71*	6.1±0.6*	24.8±0.8*
VV 12h	256±182	7.5±0.8	30.4±1.6
CONTROLE 12h	423±173	6.3±0.8	37.3±3.1
IL-10 24h	396±166**	6.1±0.4**	24.5±4.9**
CONTROLE 24h	104±38	10.1±0.8	32.1±8.4

Efeito da transfecção gênica de hIL-10 na função pulmonar pós-transplante: parâmetros fisiológicos. * $p<0.05$ versus vetores vazios, ** $p<0.05$. Abreviações: U/S – razão de peso úmido-seco; PPVA – pico de pressão nas vias aéreas; VV vetores vazios.

Os níveis de PaCO₂ mantiveram-se estáveis em ambos os grupos, sem diferenças significativas. Da mesma forma, a pressão arterial média, a pressão de

enchimento da artéria pulmonar e a elastância não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (valores não demonstrados).

Citocinas pró e antiinflamatórias no plasma do receptor e homogeneizado de pulmão transplantado

ELISA foi usado para medir FNT- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 porcinas, e IL-10 humana no tecido homogeneizado do pulmão e no plasma, na conclusão do período de reperfusão.

A hIL-10 tecidual foi detectável somente nos grupos nos quais os animais receberam AdhIL-10. Os níveis de hIL-10 no plasma não foram detectáveis em todos os animais receptores no grupo de 12 horas de transfecção (Estudo A). O mesmo foi verificado no grupo de transfecção 24 horas (Figura 15).

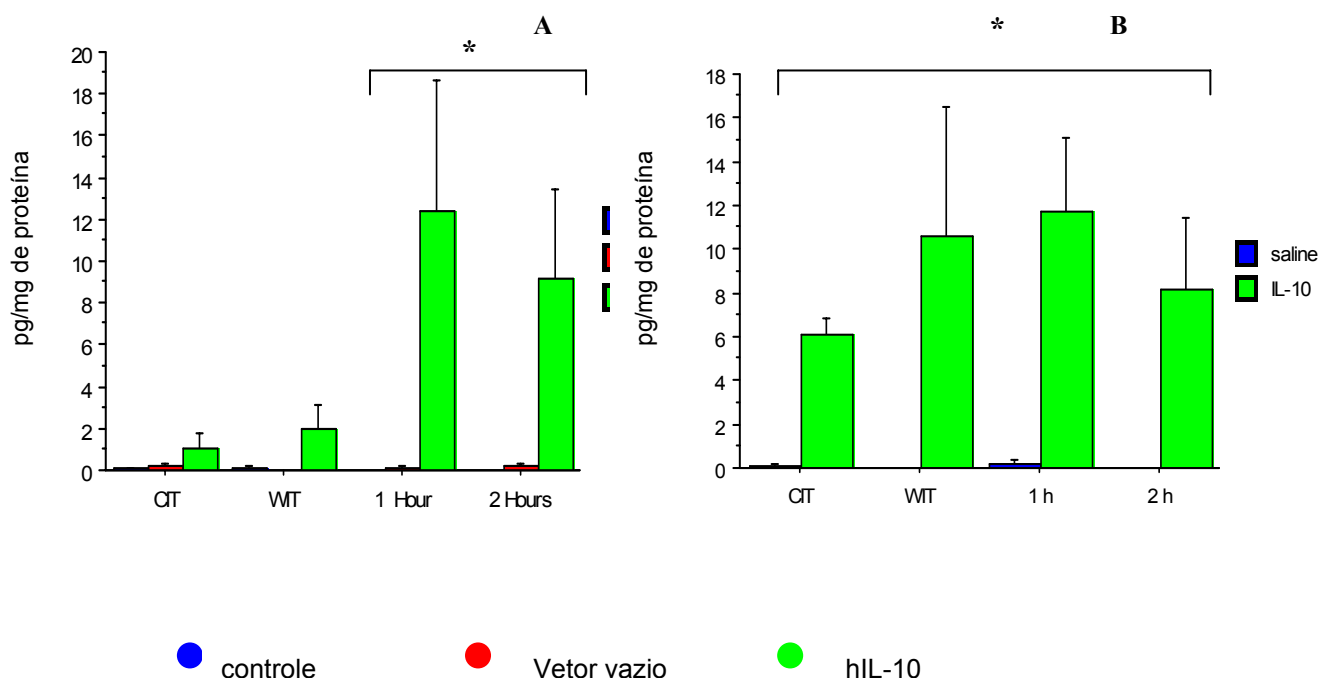


Figura 15 – Expressão de hIL-10 durante o transcurso do transplante de pulmão (grupos de 12h e 24h de tempo de transfecção gênica, respectivamente **A** e **B**). $*p \leq 0.05$. Abreviações: TIF: tempo de isquemia fria; TIM: tempo de isquemia morna; 1h: 1 hora após reperfusão; 2h: 2 horas após reperfusão.

Verificaram-se níveis reduzidos de IL-6 suína no tecido pulmonar do grupo AdhIL-10 no estudo A, quando comparado ao grupo com transfecção de vetores vazios, porém sem significância estatística ($p < 0.07$). Quando analisamos os resultados dos grupos no estudo B, houve um aumento dos níveis de IL-6 nos controles, e um bloqueio de sua liberação no grupo AdhIL-10 -24h ($p < 0.006$ na 1^a hora e $p < 0.002$ na 2^a hora após *reperfusion*). No plasma do receptor, os grupos do estudo A evidenciaram um importante aumento no nível de IL-6 no grupo vetor vazio quando comparado com o grupo AdhIL-10 no tempo todo dos experimentos. Altos níveis são atingidos após 2 horas do transplante do pulmão (0 min após a *reperfusion*: 5.6±5.6 controle; 73.1±27.3 vetor vazio; 8.9±8 AdhIL-10. 60 min após a *reperfusion*: 58.6±16.7; 134.9±30.8; e 35.4±5.9, respectivamente. Após 120 min da *reperfusion*: 147±46.5; 231.3±36.9; e 69.1±26.9, respectivamente). O estudo B também foi capaz de confirmar esses resultados. Os níveis medidos foram significativamente atenuados no grupo AdhIL-10 (Figura 16). Os níveis IL-6 porcina foram elevados no tecido do pulmão e amostras do plasma principalmente no grupo vetor vazio no estudo A ($p < 0.07$), e no grupo de controle no estudo B ($p < 0.002$). Esse pode ser relacionado com uma forte reação inflamatória causada pelo vetor vazio, e um longo período de armazenamento no estudo B. Em ambos os estudos, todavia, os porcos transfectados com hIL-10 foram capazes de bloquear a liberação do IL-6, mostrando um efeito protetor neste cenário.

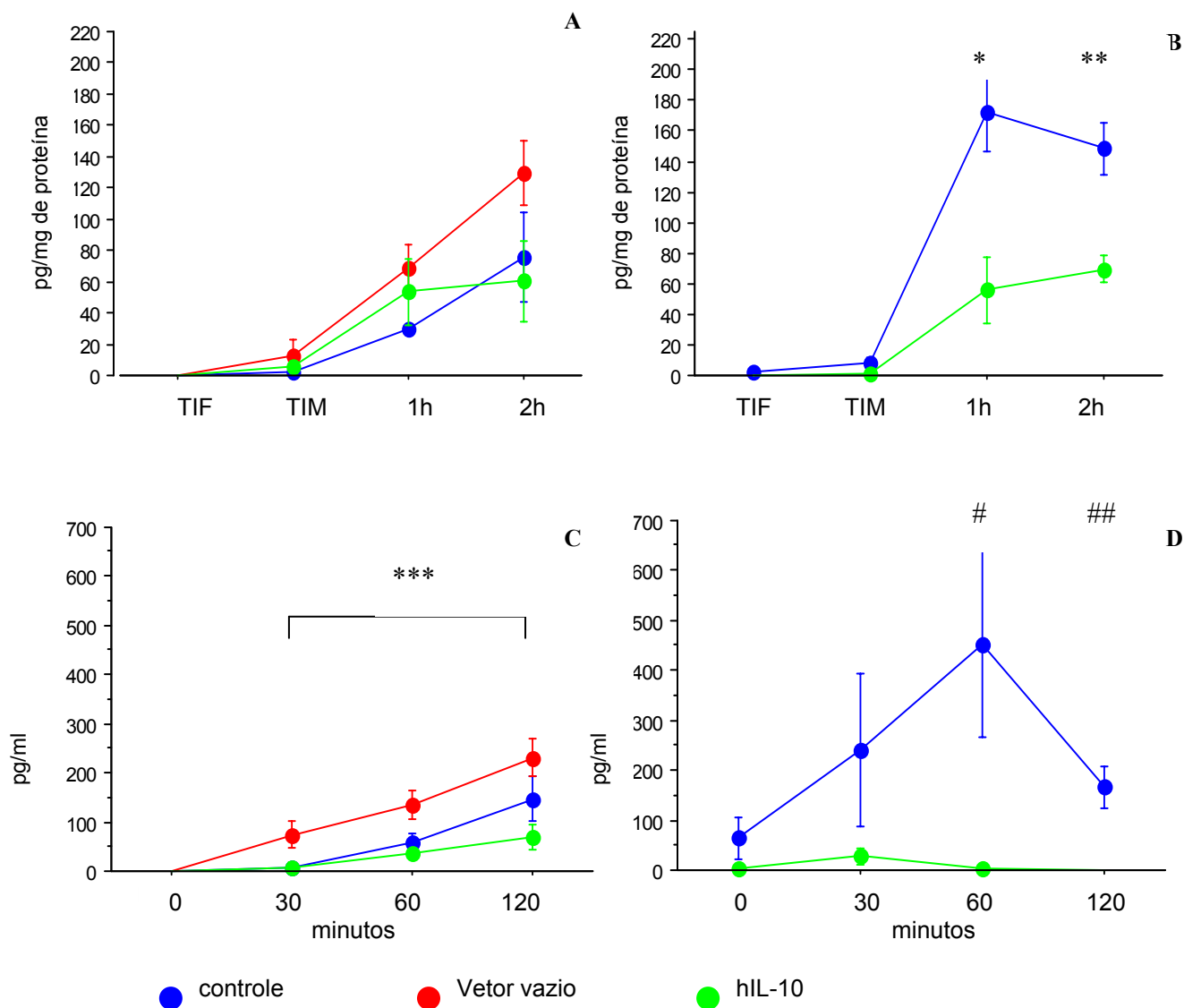


Figura 16 – Níveis de sIL-6 durante o transcurso do transplante de pulmão. O gráfico A corresponde aos níveis obtidos nas amostras de tecido homogeneizado de pulmão no estudo A ($p < 0.07$ entre os grupos VV e hIL-10). O gráfico B relaciona-se com os níveis de IL-6 obtidos nas amostras de tecido homogeneizado de pulmão no estudo B ($*p < 0.006$ na 1ª hora e $**p < 0.03$ na 2ª hora após a reperfusão do pulmão transplantado). O gráfico C demonstra os níveis de sIL-6 no plasma do receptor no estudo A ($***p < 0.05$ entre os grupos hIL-10 e VV em 30, 60 e 120 minutos após a reperfusão); o gráfico D mostra os níveis séricos de sIL-6 no receptor no estudo B ($\#p < 0.03$ e $###p < 0.002$ em 60 e 120 minutos de reperfusão, respectivamente). *Abreviações:* TIF: tempo de isquemia fria; TIM: tempo de isquemia morna; VV vetor vazio, hIL-10 grupo com transfecção Ad5E1RSVhIL-10

Os resultados de IL-8 suína no tecido pulmonar não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no estudo A. Quando analisamos os resultados dos grupos no estudo B, houve um aumento dos níveis de IL-8 nos controles, e um bloqueio de sua liberação no grupo AdhIL-10 -24h ($p < 0.02$ na 2^a hora após reperfusão) (Figura 17). No plasma do receptor, os grupos do estudo A não evidenciaram diferenças significativas entre os três grupos. No estudo B houve diferença estatisticamente significativa somente em 30 minutos após a reperfusão ($p < 0.02$). Esses resultados podem ser relacionados como os achados da sIL-6. Em ambos os estudos, todavia, os porcos transfectados com hIL-10 foram capazes de bloquear a liberação do IL-6 e da sIL-8 na 2^a hora de reperfusão, mostrando novamente um bloqueio das interleucinas pró-inflamatórias.

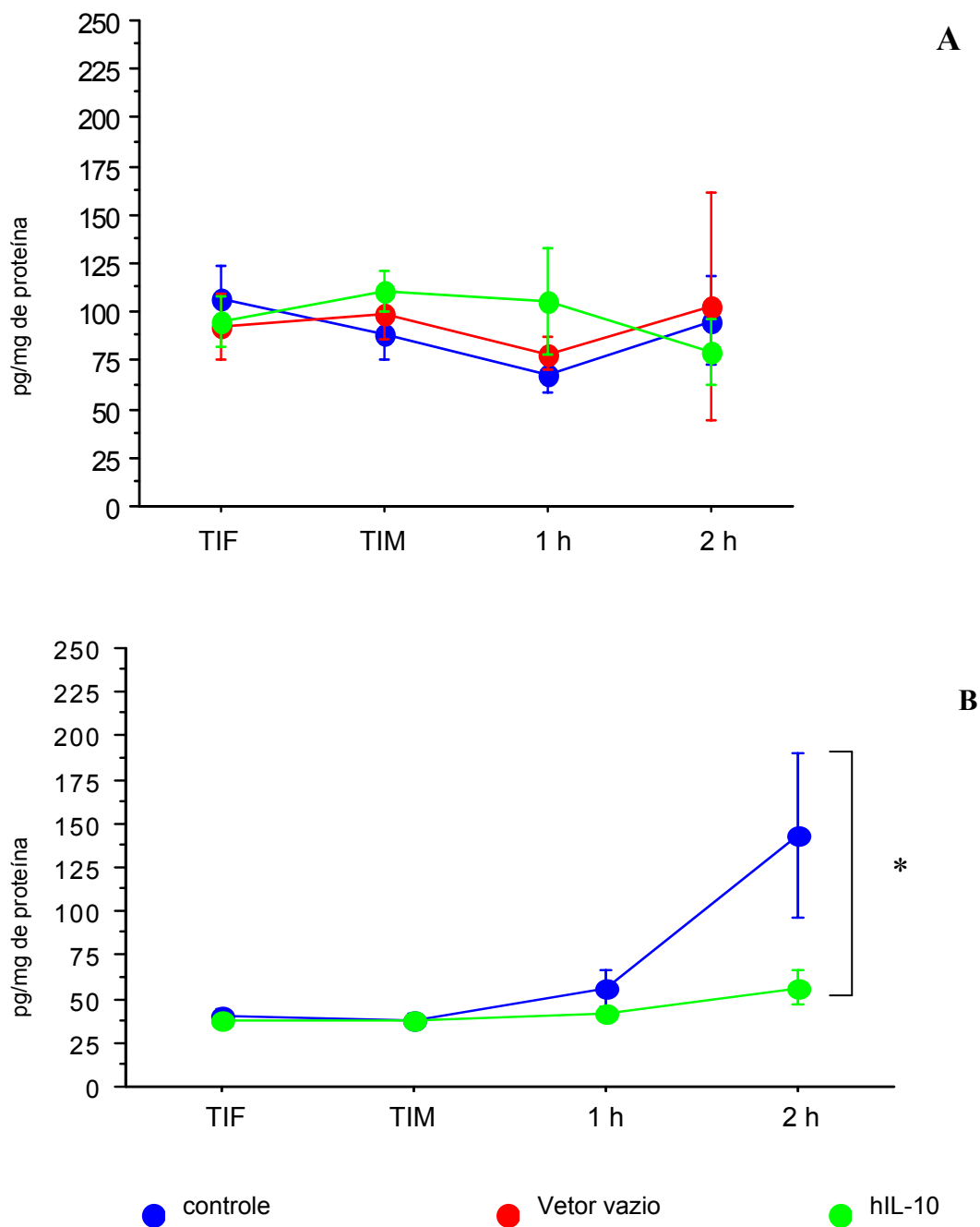


Figura 17 – Níveis de sIL-8 durante o transcurso do transplante de pulmão. O gráfico **A** corresponde aos níveis obtidos nas amostras de tecido homogeneizado de pulmão no estudo A. O gráfico **B** relaciona-se com os níveis de IL-8 obtidos nas amostras de tecido homogeneizado de pulmão no estudo B ($*p < 0.02$ na 2ª hora após a reperusão do pulmão transplantado).. Abreviações: TIF: tempo de isquemia fria; TIM: tempo de isquemia morna; VV vetor vazio, hIL-10 grupo com transfecção Ad5E1RSVhIL-10

A produção de endógena IL-10 porcina nos grupos de estudos não demonstrou um perfil diferente da expressão hIL-10 no grupo de transfecção de 12 horas. O nível de IL-10 no parênquima pulmonar - AdhIL-10-24 horas - mostraram tendência à redução, comparados com os controles após 2 horas da reperfusão (15.8 ± 3.3 pg/mg proteína nos controles; e 10.2 ± 0.5 pg/mg proteína nos AdhIL-10 $p \leq 0.1$). Esses resultados também foram observados por outros (de Waal Malefyt *et al.*, 1991). A IL-10 tem um efeito auto-regulador em sua própria liberação. No presente trabalho, foi determinado que a produção endógena de IL-10 não foi diminuída pela transfecção de hIL-10 no cenário de 12 horas de transfecção e 18 horas de armazenamento a 4°C; todavia, após 2 horas de reperfusão no estudo B - 24 horas do tempo de transfecção e 24 horas de armazenamento - ocorreu uma tendência para inibição de produção endógena de IL-10. Fischer e co-autores (2001) demonstraram previamente que a transfecção de hIL-10 em ratos foi capaz para bloquear a produção endógena de IL-10.

Outras citocinas porcinas pró-inflamatórias (FNT- α , IFN- γ , IL-2) aumentadas no início dos estudos em transplante de pulmão, usando pequenos animais, não foram bloqueadas por neste estudo com animais maiores no estudo A (Tabela 5) e no estudo B (Tabela 6), com exceção de sIL-8 e sIL-2 na 2^a. hora pós-reperfusão.

A correlação de citocinas pró-inflamatórias e níveis de oxigenação sanguínea após 2 horas de reperfusão surpreendentemente demonstrou uma nítida divisão. Os animais com AdhIL-10 apresentaram melhores níveis de PaO₂ que os do grupo-controle. As citocinas escolhidas para essa avaliação foram IL-6 e IL-8 especialmente pela sua alteração em situações de estresse impostas ao pulmão. O laboratório já havia demonstrado que em pacientes com um pobre resultado pós-

transplante, IL-8 aumenta significativamente (de Perrot *et al*, 2002) (Figura 18).

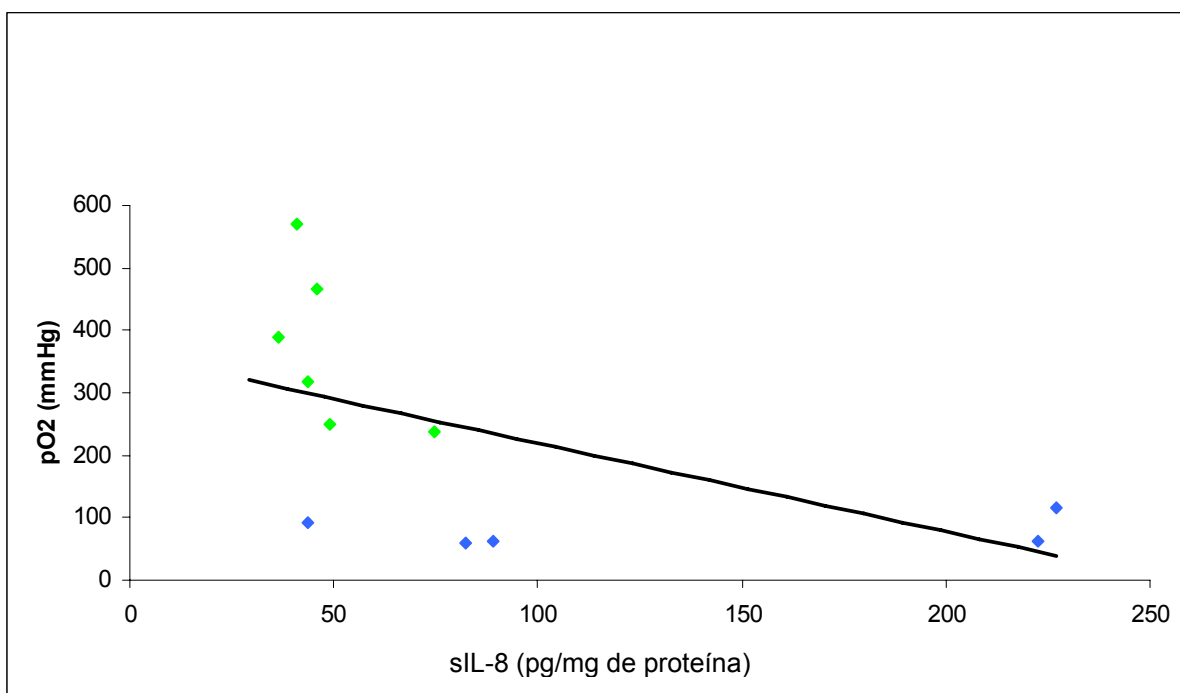
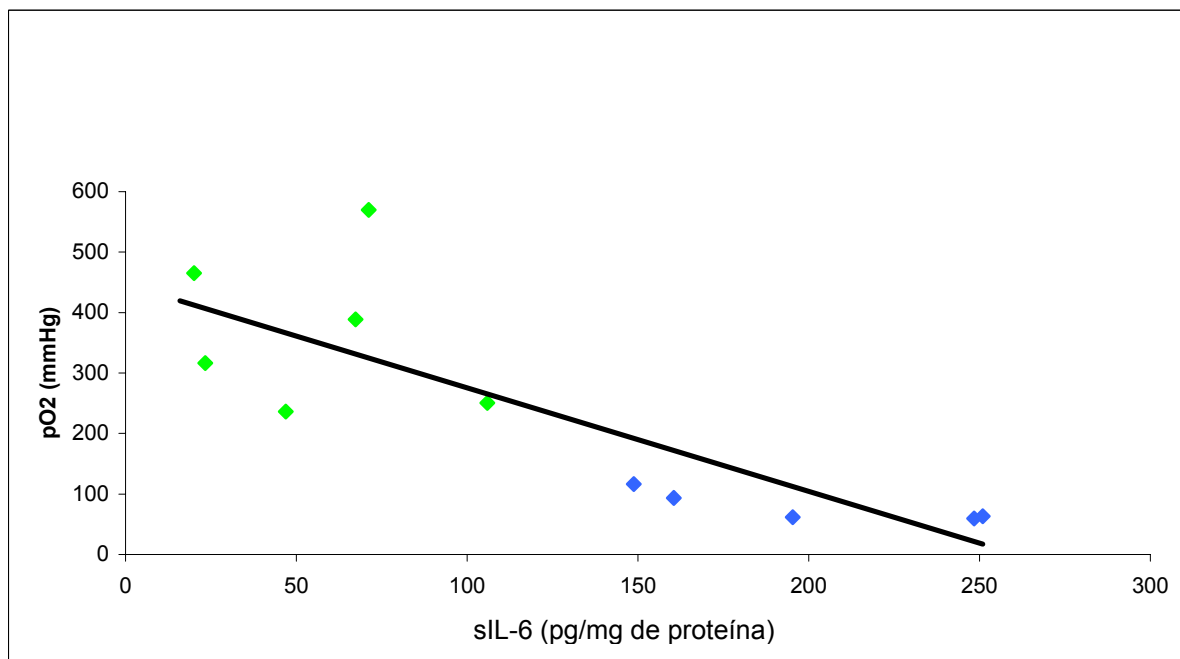


Figura 18 – Correlação entre sIL-6 e sIL-8 e a função pulmonar. sIL-6 após 2 horas de reperfusão correlaciona-se negativamente com a oxigenação arterial ($r=0.8$; $p<0.002$). sIL-8 apresenta uma distribuição mais discrepante sem significado estatístico.

Tabela 5 - Níveis de citocinas observadas após tempo de armazenamento e 2 horas de reperfusão pós-transplante no tecido pulmonar – Estudo A (média±desvio padrão em pg/mg de proteína)

		sIL-2	sIL-8	sIL-10	sFNTα	sIFN-γ
TIF	CONTROLE	7.0±0.1	106.6±37.5	7.6±4.1	22.5±3.3	21.1±9.3
	VV	8.3±1.4	92.4±37.1	10.1±2.7	17.7±4.5	14.7±11.5
	AdhIL-10	10.6±1.3	94.9±28.7	11.4±3.8	18.5±6.2	16.7±10.2
TIM	CONTROLE	11.5±0.3	89±29	7.1±3.8	19±6.1	12.5±3.3
	VV	9.8±2.6	99.1±29.9	10.7±5.6	20±4.6	13±3.9
	AdhIL-10	9.4±3.3	110.1±23.4	14.2±4.6	23.8±7.8	15.6±4
1 h	CONTROLE	6.7±0.2	67.1±18.7	5.5±3.01	11.8±2.8	8.17±3.3
	VV	6.7±0.9	78.4±19.1	7.9±1.5	14.9±3.5	10.8±4.8
	AdhIL-10	6.16±2.6	105.9±61.2	10±4.8	18.3±3.8	11.8±9.6
2 h	CONTROLE	5.5±0.1	95.6±49.9	4.7±2.1	12.1±3.1	6.7±2.1
	VV	6.1±1.9	102.8±130.5	8.1±3.7	11.7±8.2	11.1±14.2
	AdhIL-10	4.8±0.9	79.5±38.9	8.5±3.1	11.4±3.9	8.4±5.1

Abr.: TIF: tempo de isquemia fria; TIM: tempo de isquemia morna; 1 h: 1 hora após reperfusão; 2 h: 2 horas após reperfusão; sIL-2: interlucina 2 suína, sIL-8: interleucina 8 suína; sIL-10: interleucina 10 suína; sTNF α : fator de necrose tumoral- alfa suíno; sIFN γ : interferon- gama suíno.

Tabela 6 - Níveis de citocinas observadas após tempo de armazenamento e 2 horas de reperfusão pós-transplante no tecido pulmonar – Estudo B (média±desvio padrão em pg/mg de proteína)

		sIL-2	sIL-8	sIL-10	sTNF-α	sIFN-γ
TIF	CONTROLE	5.56±0.3	40.6±13.5	9.5±3.4	17.3±4.8	9.7±4.4
	AdhIL-10	5.6±0.9	37.9±7.3	9.1±2	18.8±6.4	8.3±2.1
TIM	CONTROLE	6.0±1.9	33.1±6.3	8.5±2.4	15.3±2.5	8.7±3.6
	AdhIL-10	7.2±1.7	37.2±4.3	9.1±1.6	20.6±6.5	12±5.6
1 h	CONTROLE	6.1±0.7	68.1±30.9	7.1±2.2	15.5±1.9	6.7±1.5
	AdhIL-10	7.1±0.8	41.5±9.8	9.5±3.1	21.1±4.2	7.5±3.2
2 h	CONTROLE	5.8±0.3	171.7±92	15.8±8.1	22.3±4.8	10.2±5.2
	AdhIL-10	5.1±0.7 *	56.2±23.5 **	10.3±1.4	16.9±3.3	8.6±4

Abr.: TIF: tempo de isquemia fria; TIM: tempo de isquemia morna; 1 h: 1 hora após reperfusão; 2 h: 2 horas após reperfusão; sIL-2: interleucina 2 suína, sIL-8: interleucina 8 suína; sIL-10: interleucina 10 suína; sTNF α : fator de necrose tumoral- alfa suíno; sIFN γ : interferon- gama suíno. * $p < 0.03$; ** $p < 0.02$.

Inflamação pós-transfecção

A verificação do processo inflamatório nas lâminas dos tecidos pulmonares pós-transfecção revelaram resultados evidentes. A inflamação alveolar no grupo vetor vazio foi significativamente mais intensa do que no grupo controle. Células infiltrativas foram encontradas dentro do espaço de ar alveolar e interstício; inflamações peribrônquica e perivascular foram também muito intensas no grupo vetor vazio. A lesão epitelial das vias aéreas foi evidente no vetor vazio e menos acentuada no AdhIL-10. O grupo de AdhIL-10 mostrou uma leve inflamação peribrônquica e alveolar. Os animais controles não mostraram lesão epitelial nas vias aéreas durante todo o tempo de curso destes estudos (Figura 19).

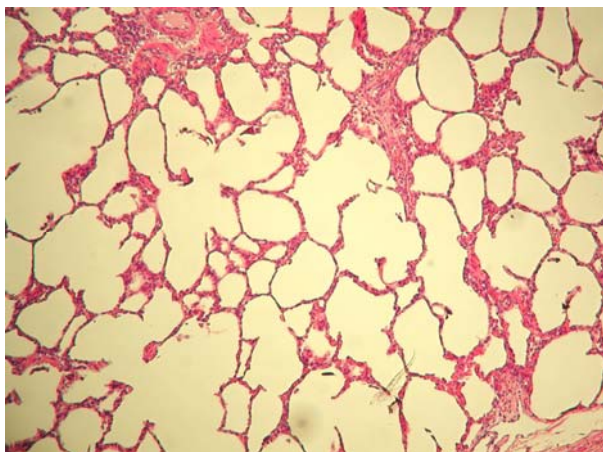
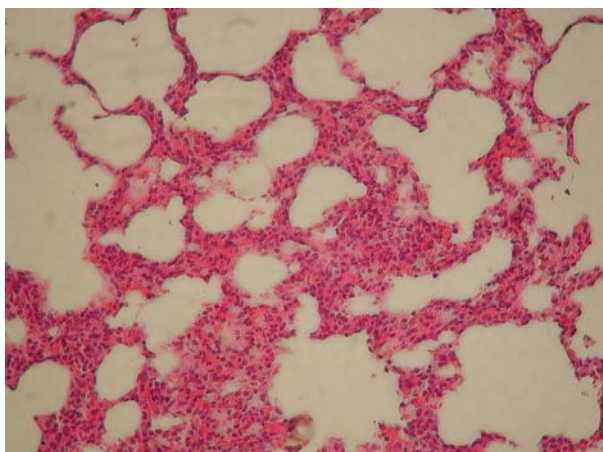
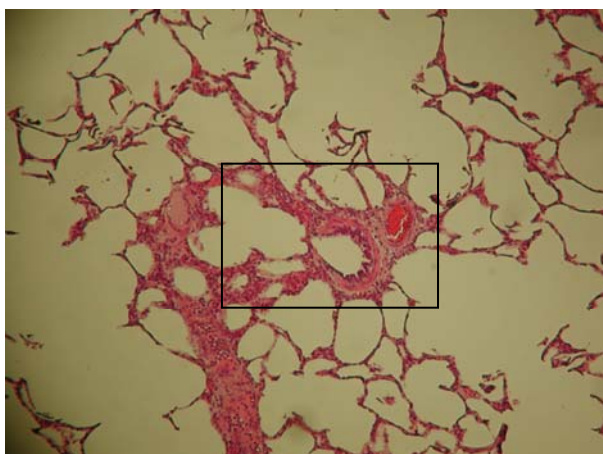
**A****B****C**

Figura 19 – A coloração com hematoxilina-eosina na graduação do processo inflamatório demonstra uma forte resposta inflamatória ao grupo onde foi usado vetores vazios (quadro **B**); a resposta inflamatória parece limitar-se aos pontos em houve transfecção nos alvéolos no grupo com AdhIL-10 (quadro **C**); e mínima resposta inflamatória no grupo controle (quadro **A**).

DISCUSSÃO

Os pulmões têm a possibilidade única de serem transfectados diretamente, evitando uma desnecessária distribuição para outros órgãos. A transferência de hIL-10 por via endobrônquica parece ser uma técnica segura e eficiente para a transferência genética. Estudos têm demonstrado a eficácia da transferência dos vetores adenovirais de transgenes *in vitro* e *in vivo* (Cassivi *et al.*, 1999; Cipolla *et al.*, 2000; Hiratsuka *et al.*, 1999; Jobe *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1998; Kools *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 1997; Partovian *et al.*, 2000; Shean *et al.*, 2000; Van Gonkel *et al.*, 1995; Whitehead *et al.*, 1993; Worgall *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1995 a; Yano *et al.*, 1999 a; Yano *et al.*, 1999 b; Zeigler *et al.*, 1996). Kanaan e colaboradores (2001) demonstraram melhores níveis de transfecção em pulmões de ratos usando a rota intratraqueal ao invés do intramuscular, intraperitoneal, intravascular, e intratorácica. Tagawa e colegas (2002), usando transfecção endobrônquica em baixas doses para os doadores, obtiveram, em ratos, uma melhora da função pulmonar e redução da lesão de isquemia e reperfusão. A maioria dos estudos tende a usar técnicas complexas de transfecção gênica para os pulmões (McDonald *et al.*, 1997; Katkin *et al.*, 1997; Racza *et al.*, 1998) e relativamente difíceis para a aplicação clínica, necessitando de amplos recursos técnicos, e, muitas vezes, expondo a equipe aos riscos dos sistemas de inalação, *i.e.* a transferência via aerossol. Apesar de muitos estudos utilizarem a aerossolização, parece-nos que essa técnica depende de muitas variáveis: *i)* concentração de partículas em aerossol, *ii)* tamanho da partícula (gota) (Gautan *et al.*, 2000; Cipolla *et al.*, 2000). Estes estudos mostraram que grandes partículas muitas vezes impactam nas grandes vias aéreas não alcançando, dessa forma, os alvéolos; *iii)* da ventilação minuto e da retenção de partículas (McDonald *et al.*, 1997). Nesse estudo, todavia, a transferência

endobrônquica mostrou-se uma técnica simples. Quando este método for usado em um cenário clínico real, é essencial a praticidade dos aparelhos e equipamentos para o grupo de retirada e coleta de órgãos. A técnica endobrônquica é altamente eficiente; a dose administrada alcançará os segmentos pulmonares, independentemente do volume. Mesmo pequenas quantidades de líquido introduzido através das vias aéreas podem chegar aos alvéolos, como previamente descrito por Kharasch e colaboradores (1991). A técnica endobrônquica também tem a vantagem da seletividade: usando um broncoscópio flexível, é possível escolher entre a transfecção de único ou ambos os pulmões, que não é factível com outras técnicas de distribuição de vetores por outras vias. A segurança é outro aspecto a ser considerado: pequenas partículas do sistema em que se utiliza aerossol podem facilmente extravasar do sistema, expondo a equipe envolvida neste procedimento. A distribuição endobrônquica também mostra-se acurada, pois a dose é previamente determinada e, introduzindo-se através de um meio líquido, torna-se remota a possibilidade de perda do material por dispersão nas vias aéreas

O sucesso da terapia genética está intimamente relacionado com uma quantidade apropriada de um gene terapêutico inserido no tecido alvo sem toxicidade substancial. Uma relação dose-toxicidade para múltiplos órgãos, especialmente fígado e pulmão, assim como anormalidades da coagulação sanguíneas são descritas em primatas não-humanos (Lozier *et al.*, 2002). Investigadores obrigam-se a escolher entre aceitar um grau alto de inflamação e citotoxicidade acompanhando a administração de doses mais elevadas de vetor, que irão por sua vez encurtar a duração da expressão transgênica, ou usar doses mais baixas, atingindo uma transdução mais limitada (Cartmell *et al.*, 1999; Cotton *et al.*, 1994; Geissler *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 1995;

Hasegawa *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Zsengeller e co-autores (1997) demonstraram que vetores adenovirais podem romper a homeostase do surfactante em pulmões de camundongos. Gerdes e colaboradores (2000) postularam que citotoxicidade e reação inflamatória estão fortemente relacionadas com a eficiência dos promotores adenovirais. Usando genes de informação (*β -galactosidase*), Gerdes demonstrou que, acompanhando a transdução adenoviral mediada da célula do cérebro *in vivo*, uma única unidade viral infectante é capaz de produzir níveis detectáveis de expressão transgênica e transferência genética dentro do cérebro próxima de 100%. Dessa maneira, o aumento da dose do vetor não é seguida por resultados melhores. Basicamente, a transferência endobrônquica possibilita diminuir a quantidade de vetor necessário para uma transfecção eficaz (Tagawa *et al.*, 2002).

A determinação da dose para uma transfecção ativa, mas não tóxica, em um modelo de animal grande é uma missão complexa. Trabalhos prévios têm indicado que altas doses de transferência adenoviral mediada levam à lesão no endotélio vascular. Nos pulmões, bronquiolites ativas e infiltrado inflamatório agudo ou crônico pode ser vistos (Morral *et al.*, 2002). Demonstrou-se no presente estudo que uma dose baixa como 4×10^{10} *pfu/ml* em apenas um pulmão (esquerdo), em um modelo suíno, não induziu a uma situação tóxica com repercussão fisiológica sistêmica, e mostrou-se altamente eficiente e seletiva. Todos os animais permaneceram hemodinamicamente estáveis no experimento. Da mesma forma, não existiram sinais sistêmicos de infecção viral. Os outros órgãos – coração, pulmão direito, baço, fígado e rins – não apresentaram níveis detectáveis de hIL-10 através das análises *ELISA*, mesmo quando o período de transfecção foi aumentado para 24 horas.

A terapia genética tem basicamente duas vantagens muito importantes no cenário de transplante clínico. Primeiro, sabe-se que a IIR ocorrerá em um ponto de tempo previsível. Isso permite a aplicação de abordagens de precaução a serem aplicadas antes do insulto ocorrer. Segundo, a transfecção acontece nas células não-enfermas com todos os componentes da membrana intactos, fornecendo uma melhor endocitose. Ao contrário de outras desordens, onde a terapia genética pode ser empregada como uma modalidade terapêutica, em IIR significativas que ocorrem após o transplante do órgão, uma expressão transitória da proteína desejada é requerida, por um período relativamente curto. Assim, a terapia gênica poderia ser efetiva no transplante, onde o enxerto pulmonar próprio pode usar a maquinaria de síntese de proteína para expressar um gene estrangeiro, e ter a proteína protetora correspondente (IL-10) já sintetizada na hora da reperfusão de enxerto. Além disso, é possível limitar a reação inflamatória e as respostas imunes do receptor, pois há a necessidade de imunossupressão com drogas que atuam diretamente no sistema, bloqueando as cascatas intracelulares de modulação à reação imune. Cassivi e colaboradores (1999) acenaram, ainda, com a possibilidade de se efetuar retransfecção, como um meio de fornecer uma terapia gênica de longa duração. Todavia, esse processo é significativamente limitado pela resposta imune, acreditando-se que a incapacidade de transfecção efetiva seja devido a anticorpos neutralizantes produzidos pelas células B em resposta à apresentação das proteínas virais inseridas ao complexo de histocompatibilidade classe II.

Neste estudo, a transfecção hIL-10 reduziu a injúria de isquemia-reperfusão. Os resultados fisiológicos dos pulmões mostraram uma melhora na função do órgão, notada principalmente nos níveis de PaO₂ – padrão-áureo adotado para a avaliação da

performance pulmonar – no grupo com AdhIL-10. Um achado importante foi que os resultados PaCO₂, em todos os grupos, não tinham mostrado diferenças significantes; portanto não houve retenção de CO₂ devido à lesão na membrana de troca. Outras informações, como o pico de pressão nas vias aéreas e a razão de peso úmido-seco do parênquima pulmonar demonstraram uma propensão à melhora da função do pulmão nos grupos transfectados com AdhIL-10. A média da pressão sanguínea sistêmica permaneceu estável em todos os grupos.

Muitos estudos têm mostrado a toxicidade mediada por vetores adenovirais, especialmente dose-relacionada. Neste estudo, no grupo com vetores vazios demonstrou-se uma forte reação tóxica, com a oxigenação sangüínea confirmando a ocorrência de uma grave lesão no parênquima pulmonar. Essa lesão foi também comprovada pelos resultados das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 IL-8, e na análise histológica - colorações por hematoxilina-eosina-. Os mecanismos para esta ação são intimamente relacionados com a ação da hIL-10. A habilidade da IL-10 para inibir a produção de citocina por ambas as células T e *Natural Killer* foi indireta, via interferência com a função de células acessórias (macrófagos/monócitos) (de Waal Malefyt *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1993). A IL-10 inibe a produção de FNT- α e IFN- γ pelos macrófagos e outros tipos de células que, em parte, explicam seu efeito antiinflamatório em pequenos animais (Fischer *et al.*, 2001). Em estudos com aloenxertos vascularizados de coração em camundongos, o tratamento de IL-10 anterior à enxertia dos animais receptores melhorou a sobrevivência do órgão transplantado (Li *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram também obtidos por aloenxertos de fígado em ratos (Zou *et al.*, 1998). Em um modelo de IIR do miocárdio, a IL-10 exógena administrada teve um efeito protetor, traduzido na redução da creatinoquinase

miocárdica e atenuação da atividade da mieloperoxidase cardíaca (Hayward *et al.*, 1997). A IL-10 endógena pode regular a resposta imune mediada por células Th1, a qual induz a glomerulonefrite (Kitching *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que a deficiência de IL-10 está relacionada com o desenvolvimento de enterocolite crônica (Kuhn *et al.*, 1993). Há associação descrita de IL-10 com a resposta hiperativa das vias aéreas após sensibilização alérgica (Mäkelä *et al.*, 2000). Ralph e colaboradores (1992) evidenciaram que IL-10 é capaz de bloquear a produção de FNT- α e IL-1. Na injúria de isquemia-reperfusão pulmonar, a administração exógena de IL-10 recombinante, 15 minutos antes do clampeamento hilar (*in situ* isquemia quente), mostrou redução dos níveis de FNT- α nos macrófagos alveolares, após 90 min de isquemia seguida por 4 horas de perfusão, quando comparada com um grupo de isquemia não-tratado. Uma redução no índice de permeabilidade microvascular pulmonar foi também observada no animal pré-tratado com IL-10 (Eppinger *et al.*, 1996). Tais observações sugerem um papel inibitório fundamental do IL-10 previamente e durante as repercussões iniciais no transplante de órgãos.

Fischer e colaboradores (2001) usando basicamente o mesmo esquema de montagem de estudo em ratos, conseguiram evidenciar uma diminuição nos níveis de FNT- α , IFN- γ , isto não foi encontrado no presente estudo. Os testes usando *ELISA* em homogenados de tecido pulmonar e plasma do receptor não mostraram bloqueio de liberação dessas citocinas, mas houve diminuição significativa na dosagem de IL-6, principalmente no estudo B. Isso concorda com o fato de que 12 horas talvez não seja um período suficientemente longo para que o metabolismo em grandes animais desencadeie a resposta inflamatória. De Perrot e colaboradores (2001), em um estudo

clínico em pacientes submetidos ao transplante de pulmão também não demonstraram alterações com FNT- α e IFN- γ .

A lesão causada em transplante de órgãos não se limita somente à injúria de isquemia-reperfusão. O processo também envolve as lesões sofridas durante a morte cerebral, onde há uma alteração da regulação homeostática com profundos distúrbios nas funções endócrinas. Esses mecanismos são caracterizados pelo aumento súbito de catecolaminas circulantes associadas com hipertensão sistêmica e pulmonar (tempestade autonômica) (Bittner *et al.*, 1995). Da mesma forma, as soluções de preservação, a despeito de uma contínua melhora, ainda exibem uma duração limitada no tempo de proteção do órgão. Poucos estudos têm analisado os efeitos do volume, pressão e a temperatura da solução durante o *flushing*. Haverich e co-autores (1986) demonstraram que pulmões irrigados com soluções de preservação em rápidas instilações de volume apresentaram melhor esfriamento e melhor função após a reperfusão. Embora pulmões desinsuflados possam ser seguramente preservados em baixas temperaturas, por 5-6 horas em humanos e por mais de 24 horas em modelos porcos (*The Toronto Lung Transplant Group*, 1988; Steen *et al.*, 1994 a; Steen *et al.*, 1994 b), há um grande número de experimentos desde a década de 1970 sugerindo que a preservação é mais efetiva quando os pulmões são mantidos inflados com oxigênio (Sakuma, *et al.*, 1999; Thomas & Buchman, 1971; Van Raemdonck *et al.*, 1997; Veith *et al.*, 1971; Veith *et al.*, 1976). É relevante destacar os efeitos prejudiciais do armazenamento em isquemia fria: a hipotermia diminui o metabolismo, as reações bioquímicas são diminuídas e a velocidade de degradação dos componentes celulares essenciais para a viabilidade do órgão é reduzida. Um número de eventos ocorre com a isquemia fria: inativação da

bomba de sódio, acidose intracelular, aumento de cálcio, estresse oxidativo, disfunção do surfactante pulmonar e, conseqüentemente, morte celular.

Atualmente, um período de 6 horas equivale ao período admitido de armazenagem em transplante de pulmão, enquanto 18 a 24 horas de armazenagem fornecem um modelo com IIR após transplante. O próximo passo, após o estudo A, foi aumentar o tempo do período e isquemia fria, uma vez que se concluiu que 12 horas de transfecção e 18 horas de armazenagem não foram suficientes para criar injúria nos animais do grupo controle. Nesse momento, foi essencial criar um pulmão mais lesado. Ampliou-se, então, o tempo de transfecção para 24 horas (os mais altos níveis de transfecção hIL-10 em pulmões doados), e igualmente um mais longo armazenamento (24 horas) para se obter um pulmão doador com grande lesão. Esta meta foi atingida no estudo B com esse aumento de tempo de isquemia fria: os animais com hIL-10 – 24 horas de transfecção de pulmão - mostraram significativos níveis mais altos de PaO₂ do que pulmões que receberam o diluente após 2 horas de reperfusão (396.2±166.7; 104.3±38.1, AdhIL-10 e controle, respectivamente, $p<0.05$) (Figura 14).

Decidimos estender o período de armazenagem para 24 horas com o intuito de aumentar a injúria dos pulmões. O transcurso deste estudo comprovou que 18 horas de tempo de isquemia fria não causou dano pulmonar suficiente no grupo de controle. Em modelos prévios com ratos no laboratório de cirurgia torácica da Universidade de Toronto, a transferência genética mediada de hIL-10 no pulmão dos doadores melhorou a função do pulmão de ratos receptores após 6 e 24 horas de preservação, mas após 24 horas os resultados fisiológicos, principalmente a PaO₂, mostraram-se melhores (mais altos) – dados não publicados. No presente estudo, um segundo momento, aumentando-

se o tempo de armazenagem para 24 horas, mostrou-se que a hIL-10 teve um efeito protetor no enxerto de pulmão.

A eficiência da transferência genética e expressão dependem da presença de receptores virais apropriados em alta densidade, dos processos de internalização viral e transferência do genoma a partir dos endossomos para o núcleo das células infectadas, e da eficiência da transcrição–tradução transgênica (Gerdes *et al.*, 2000). O tempo de transfecção é também importante para a eficiência. O grupo de Toronto demonstrou que, nas primeiras horas após a transfecção, há uma piora nos resultados de variáveis fisiológicas: níveis baixos de PaO₂, mais provavelmente relacionados com a reação inflamatória inicial devido ao vetor adenoviral. Assim, quando estudadas 12 horas e 24 horas do tempo de transfecção, não houve diferenças estatísticas e clínicas entre esses dois grupos em um modelo com ratos. Li e colaboradores (1999) provaram que fornecendo IL-10 no momento ou após o procedimento de enxertia havia apenas um pequeno efeito benéfico no tocante à rejeição, ou até mesmo uma piora do quadro. Estudos em ratos têm mostrado até agora que 10⁷ – 10⁹ unidades infecciosas por mililitro (*pfu/ml*) são necessárias ser injetadas no pulmão para detectar-se expressão transgênica mensurável. Em grandes animais, doses como 10¹³ *pfu/ml* podem produzir lesão em múltiplos órgãos. Doses crescentes dos vetores adenovirais de primeira-geração distribuídos no cérebro de ratos estão relacionados com crescente citopatogenicidade, não se correlacionando, todavia, com transdução mais alta após administração do vetor (Thomas *et al.*, 2000). Contudo, a expressão da proteína do gene transfectado é dose-dependente (Partovian *et al.*, 2000). A chave central é obter um nível relevante protetor sem maiores lesões. Este estudo provou que 4x10¹⁰ *pfu/ml* no pulmão esquerdo no transplante de pulmão em porcos doadores alcança essas metas.

Doses baixas de proteína IL-10 exógena tendem a ser protetoras, enquanto doses mais altas agravavam a rejeição (Zou *et al.*, 1998). Esse aspecto é mais difícil de avaliar em estudos de transferência genética por causa da quantidade de IL-10 biodisponíveis, da eficiência da transferência de vetor, dos níveis de expressão em células infectadas e de suas locações clínicas *in vivo*, e, finalmente, de quão rápido suas expressões ou viabilidade estarão comprometidas pelas reações do receptor e meia-vida do IL-10 *in vivo*. Os efeitos perceptíveis do IL-10 nos aloenxertos de órgãos são resultados de múltiplos fatores incluindo tempo, quantidade e cinética das citocinas, assim como o impacto relativo de atividades diferentes do IL-10 em cada combinação particular experimental e sistema modelo (Moore *et al.*, 2001). Ficou demonstrado no presente trabalho que a reação da produção de endógena de IL-10 suína não melhora a IIR adequadamente, mas a transfecção adenovirus-mediada de hIL-10 para os pulmões dos doadores, *in vivo* 24 horas antes da retirada do órgão e o transplante, melhora a função inicial do enxerto após o transplante pulmonar. Os níveis endógenos de IL-10 foram semelhantes àqueles detectados nos pulmões após 12 horas de transfecção *in vivo*. Isso indica que o curto tempo de transfecção *in vivo* de 12 horas provavelmente não ter efeitos tão consideráveis nos resultados pós-transplante, quando comparados à abordagem usando-se 24 horas de transfecção *in vivo*. Curiosamente, em trabalhos prévios em ratos, tempos de 6, 12 e 24 horas de transfecção *in vivo*, pré-retirada do órgão, tiveram os mesmos resultados na função do pulmão enxertado (Cassivi *et al.*, 1999; De Perrot *et al.*, 2001; Fischer *et al.* 2001).

Havia também sido mostrado que um curto tempo de transfecção não aumentava a PaO₂, ocorrendo justamente o oposto (de Perrot *et al.*, 2001). Aumentando-

se o tempo no modelo, entretanto, níveis mais altos de oxigenação nos tecidos foram atingidos. Desse modo, após a conclusão de duas horas do período de reperfusão, os níveis de PaO₂ nos pulmões foram significativamente mais elevados do que em pulmões *vetor vazio* ($p < 0.05$). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos hIL-10 e controle (510.9±71.4; 423.02±173.5; e 256.5±182.1, AdhIL-10, controle e vetor vazio, respectivamente). Nessa fase do estudo, observou-se que o tempo de 18 horas de isquemia fria não casou injúria grave nos pulmões, com redução significativa da oxigenação. Os estudos concluíram que as soluções de preservação são capazes de manter a função do pulmão por períodos superiores a 24 horas (Date *et al.*, 1993; Steen *et al.*, 1994 a; Steen *et al.*, 1994 b). Contudo, verificou-se que os grupos de animais de vetor vazio tiveram uma dramática redução dos níveis de PaO₂. Essa foi uma das nossas primeiras descobertas deste estudo: o produto adenoviral usado causa uma acentuada reação inflamatória, piorando a função do pulmão. Quando a hIL-10 foi introduzida no vetor-adenoviral, ela resgatou a lesão induzida pelo *vetor vazio*; nessa situação, a função do pulmão foi melhorada e a reação antiinflamatória diminuída (Figura 13).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que pode ser correlacionada com prognóstico clínico de lesão pulmonar (*The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*, 2000). A produção de IL-6 diminui em administração de IL-10 *in vivo*, inibindo a produção *ex vivo* de LPS- induzido de IL-6, IL-1 e FNT- α em testes com todas as células sangüíneas e reduz a resposta proliferativa e produção de IFN- γ , assim indicando que a IL-10 possui atividades imunomodulatórias quando administrada *in vivo*. As doses devem lograr pelo menos 50% da inibição máxima da produção de FNT- α e IL-1 β , denotando que a IL-10 inibe a produção dos mediadores pró-inflamatórios *in vivo* em concentrações semelhantes àsquelas usadas em experimentos *in vitro*

(Radwanski *et al.*, 1998). A IL-6 tem mostrado possuir propriedades pró-fibróticas relacionadas com FNT- α e TGF- β (Tiroke *et al.*, 1999). A produção de IL-6 por células epiteliais e macrófagos alveolares é um dos mecanismos pelos quais o processo inflamatório pulmonar local como rejeição aguda e doenças infecciosas do pulmão são estimuladas (Borger *et al.*, 2000; Humbert *et al.*, 1993). Como mencionado antes, vários estudos têm mostrado a correlação intrínseca entre o IL-6 e a transplante de pulmão. Essa citocina é um fator prognóstico do enxerto de pulmão (Mognon *et al.*, 1994), sendo indicativa de lesão tecidual e ativação dos mecanismos inflamatórios. De fato, quando analisamos os níveis de IL-6, após 12 horas de transfecção *in vivo* e 12 horas de armazenamento pré-retirada, o único grupo que tinha mostrado uma tendência para níveis aumentados dessa citocina no parênquima pulmonar foi o grupo com vetores vazios. Além disso, encontramos níveis significativamente altos de IL-6 no plasma dos porcos receptores transfectados somente com vetores vazios. Confirmando essa tendência, no estudo B, o grupo controle, agora com 24 horas do tempo de isquemia fria, teve um nível significativamente alto no tecido homogeneizado do pulmão esquerdo transplantado e no plasma.

A correlação com a pressão parcial do oxigênio também demonstrou que os níveis de oxigenação e de IL-6 estão intrinsecamente conjugados. Para cada unidade de IL-6 que aumenta, a pressão parcial de oxigênio arterial sistêmico diminui em 1.7 unidades. É também interessante a relação entre IL-6 e a função do enxerto após o transplante, sendo ela rapidamente liberada depois da reperfusão. Achados similares de correlação entre pobre função pulmonar e níveis altos de IL-6 também foram apresentados por Mal e colaboradores (1998) e Magnan e co-autores (1994). Esses achados fazem especular que a IIR resulta em uma formação local de várias citocinas

pró-inflamatórias importantes, que, através da mediação da quimiotaxia e ativação das células inflamatórias, podem ter um papel fundamental no desenvolvimento de uma disfunção não específica precoce do enxerto.

A interleucina-8 (IL-8) é um potente fator quimiotático neutrofílico. Trata-se de uma citocina primariamente inflamatória produzida por muitas células (inclusive monócitos/macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, astrócitos e condrócitos) em resposta a estímulos pró-inflamatórios como IL-1, FNT, LPS e viroses. Sua função é, em parte, atrair neutrófilos para o local da inflamação e ativá-los (Ben-Baruch *et al.*, 1994). Condições pulmonares caracterizadas por infiltração de neutrófilos coincidem com a presença de níveis pulmonares mais altos de IL-8. Como a lesão precoce do enxerto, depois do transplante pulmonar, é caracterizada por infiltração de neutrófilos, um papel para IL-8 na patogênese deste dano pareceria biologicamente plausível. Fischer e co-autores (2000) comprovaram que pacientes de transplante pulmonar que morreram devido à disfunção precoce tinham elevados níveis de IL-8 no lavado broncoalveolar antes da retirada do órgão. Esses achados também são confirmados por de Perrot e colaboradores (2002): pacientes com pior prognóstico – óbito – devido à injúria de isquemia-reperfusão também apresentavam altos níveis de IL-8 no tecido pulmonar durante o tempo de isquemia fria e após a reperfusão. Tais níveis de IL-8 antes e depois da reperfusão podem ser um marcador de aspiração prévia, infecção em atividade no pulmão ou edema pulmonar neurogênico. No presente estudo, notou-se a rápida liberação de IL-8 no tecido do pulmão após 2 horas de reperfusão, no estudo B. Os altos níveis de IL-8 foram encontrados no grupo de controle, demonstrando a ocorrência de precoce disfunção do órgão nesse grupo, achado coerente com o que ocorre nos pacientes de transplante de

pulmão que evoluem para um mau resultado (Fischer *et al.*, 2000; de Perrot *et al.*, 2002). Na análise de correlação entre a oxigenação sanguínea, medida através de gasometria arterial, e sIL-8 no tecido pulmonar homogenado (*ELISA*) não foi possível demonstrar os mesmos resultados verificados com a sIL-6. Os valores foram discrepantes, provavelmente fruto de uma distorção de dados encontrados na análise. A IL-8 é uma importante citocina mesmo em grupos que não desenvolvem situações de risco após a reperfusão devido a sua intrínseca relação com a resposta inflamatória. Esses dados sugerem estudos a serem feitos em grandes animais onde a administração de anticorpos monoclonais neutralizantes de IL-8 no momento da reperfusão poderia prevenir a infiltração de neutrófilos e reduzir a injúria pulmonar.

Outro importante achado deste estudo foi que a transfecção endobrônquica do pulmão do doador não produz transfecção substancial em outros órgãos transplantáveis. Níveis de expressão transgênica foram desprezíveis no coração, fígado, rins, e soro dos doadores após 12 e 24 horas de distribuição nos pulmões. Deve-se salientar que esses períodos de transferência gênica incluem as 12 ou 24 horas mencionadas anteriormente a uma temperatura corporal de 37° C, seguidas de 18 ou 24 horas de isquemia fria a 4° C. Isso ressalta que a transfecção mediada por adenovírus nos pulmões via árvore respiratória é estritamente uma estratégia de distribuição local. Esses achados têm 2 principais implicações: primeiro, a rota não-invasiva traqueal para transfecção de doadores de multi-órgãos parece não ser adequada para transfecção em outros órgãos, o que é um fato relevante, já que um gene que seja benéfico para os pulmões pode não ser para outros órgãos transplantáveis. Segundo, esses resultados demonstram para os cirurgiões a possibilidade de distribuição local do doador com

vários genes possivelmente terapêuticos, sem a preocupação dos efeitos colaterais da transfecção em outros órgãos.

Pacientes transplantados estão necessariamente sujeitos à imunossupressão permanente para prevenção da rejeição do enxerto. O grupo do laboratório de cirurgia torácica da Universidade de Toronto mostrou anteriormente, em um modelo de transplante unilateral esquerdo de pulmão em ratos, que a imunossupressão do transplante com ciclosporina A, prednisona e azatioprina aumenta e prolonga a expressão transgênica após a retransfecção com vetores adenovirais (Cassivi *et al.*, 1999). Além disso, a imunossupressão do transplante também auxiliaria a superar outro obstáculo na terapia genética de adenovírus-baseada, ou seja, a imunidade pré-existente contra o adenovírus através das infecções virais adquiridas naturalmente na população humana (Chirmule *et al.*, 1999).

Em resumo, revelou-se que a transferência *in vivo* e a expressão do gene que codifica a IL-10 humana para os pulmões do porco doador é viável através do caminho endoscópico, com transfecção clínica relevante em todos os segmentos do pulmão. Este trabalho mostrou ainda que uma relação de tempo para transfecção é necessária para níveis mais altos da mesma, sem aumentar a citotoxicidade. Salientou-se que a transfecção de AdhIL-10 no pulmão do doador conduz a uma função do enxerto significativamente melhorada após o transplante do pulmão, a qual é associada com uma reação inflamatória sistêmica e local reduzida quando comparada com vetores “vazios” em 12 horas de transfecção, e versus controle (solução salina) em 24 horas de transfecção. A transferência genética endobrônquica pode, assim, ser usada para modificar geneticamente os pulmões dos doadores, expressando uma proteína desejada,

em um determinado período de tempo na reperfusão do enxerto, buscando-se, com isto, diminuir a lesão de isquemia-reperfusão e melhorar a função do pulmão transplantado.

Este estudo fornece uma estratégia original e promissora para superar um dos fatores mais significantes e contribuintes para disfunção precoce do enxerto e mortalidade no transplante de pulmão: o insulto devido à isquemia e reperfusão. A estratégia para a transferência genética nos pulmões do doador para transplante, desenvolvida neste estudo, fornece um fundamento para estudos pré-clínicos de terapia gênica e, esperançosamente, para aplicação máxima da terapia genética no transplante clínico de pulmão.

CONCLUSÕES

O estudo da transfecção gênica mediada por vetores adenovirais modificados em grandes animais permitiu concluir que:

- A transfecção genética mediada por vetores de adenovírus é possível em um modelo de animal de grande porte, atingindo-se o que foi considerado níveis clinicamente relevantes de Ad5E1RSVhIL-10 no tecido pulmonar
- A técnica endoscópica para transfecção de Ad5E1RSVhIL-10 permite a eficiente distribuição dos vetores geneticamente modificados no pulmão
- A transferência endobrônquica de genes em grandes animais pode ser usada para modificar o código genético dos pulmões de doadores, com a finalidade de expressar uma proteína desejada no momento da reperfusão do enxerto, buscando-se diminuir a injúria de isquemia-reperfusão e melhorar a função pulmonar do receptor.

FUTURAS DIREÇÕES

Nosso estudo em grandes animais, seguindo experiência prévia com ratos, lança-nos em uma nova direção no estudo do transplante de pulmão com o uso potencial da terapia gênica. Entretanto vários desafios permanecem: a transfecção de vetor precisa ser melhorada. A atual geração de vetores tem claramente ainda uma reação inflamatória significativa; precisamos de vetores mais eficazes associados a uma menor reação inflamatória e a uma taxa de transfecção mais elevada. O conhecimento básico é necessário para o redirecionamento bem sucedido dos vetores virais e para a engenharia da modulação transcripcional, a fim de maximizar a expressão transgênica, e, ultimamente, eliminar a citotoxicidade direta e inflamação. Este trabalho nos permitiu progredir na eficácia de transfecção endobrônquica, nos níveis adequados de transfecção em animais de grande porte sem toxicidade sistêmica e repercussão fisiológica de uma citocina antiinflamatória no transplante de pulmão, direcionando a vários passos importantes de nossa meta final da aplicação clínica de terapia gênica com o intuito de melhorar o resultado após o transplante de pulmão; mas ainda há trabalho para ser feito. Precisa-se melhorar nosso entendimento e aperfeiçoar o processo da transferência gênica e expressão da proteína desejada nesse cenário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON, C. L., HITT, M., KUNSKEN, D., and GRAHAM, F. L., 1997. Comparison of the Human Versus Murine Cytomegalovirus Immediate Early Gene Promoters for Transgene Expression by Adenoviral Vectors. *J Gen Virol* 78(7): 1653-61.
- ANDERSON, R. D., HASKELL, R. E., XIA, H., ROESSLER, B. J., and DAVIDSON, B. L., 2000. A Simple Method for the Rapid Generation of Recombinant Adenovirus Vectors. *Gene Ther* 7: 1034-8.
- ANDERSON, W. F., 1984. Prospects for Human Gene Therapy. *Science* 226: 401-9.
- ARMSTRONG, L., JORDAN, N., and MILLAR, A., 1996. Interleukin-10 (IL-10) Regulation of Tumour Necrosis Factor α (TNF- α) From Human Alveolar Macrophages and Peripheral Blood Monocytes. *Thorax* 51(2): 143-9.
- AVERSA, G., PUNNONEN, J., COCKS, B. G., de WAAL MALEFYT, R., VEGA JR, F., ZYRAWSKI, S. M., ZURAWSKI, G., and de VRIES, J. E., 1993. An Interleukin 4 (IL-4) Mutant Protein Inhibits Both IL-4 or IL-13-Induced Human Immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE Synthesis and B Cell Proliferation: Support for a Common Component Shared by IL-4 and IL-13 Receptors. *J Exp Med* 178: 2213-18.
- BAARSCH, M. J., SCAMURRA, R. W., BURGER, K., FOSS, D. L., MAHESWARAN, S. K., and MURTAUGH, M. P., 1995. Inflammatory Cytokine Expression in Swine Experimentally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun* 63(9): 3587-94.
- BARBARA, G., XING, Z., HOGABOAM, C. M., GAULDIE, J., and COLLINS, S. M., 2000. Interleukin-10 Gene Transfer Prevents Experimental Colitis in Rats. *Gut* 46: 344- 9.

- BARTON, B. E., 1997. IL-6: Insights into Novel Biological Activities. *Clin Immunol Immunopathol* 85(1):16-20.
- BEN-BARUCH, A., BENGALI, K. M., BIRAGYN, A., JOHNSTON, J. J., WANG, J., KIM, J., CHUNTHARAPAI, A., MICHIEL, D. F., OPPEINHEIM, J. J., and KELVIN, D. J., 1994. Interleukin-8 Receptor β - The Role of the Carboxyl Terminus in Signal Transduction. *J Biol Chem* 270(16): 9121-8.
- BENHAMOU, P. Y., MULLEN, Y., SHAKED, A., BAHMILLER, D., and CSETE, M. E., 1996. Decreased Alloreactivity to Human Islet Secreting Recombinant Viral Interleukin-10. *Transplantation* 62(9): 1306-12.
- BITTNER, H. B., KENDALL, S. W., CHEN, E. P., CRAIG, D., and VAN TRIGT, P., 1995. The Effects of Brain Death on Cardiopulmonary Hemodynamics and Pulmonary Flow Characteristics. *Chest* 108: 1358-63.
- BOASQUEVISQUE, C. H., MORA, B. N., SCHMID, R. A., LEE, T. C., NAGAHIRO, I., COOPER, J.D., and PATTERSON, G. A., 1997. *Ex Vivo* Adenoviral-Mediated Gene Transfer to Lung Isografts During Cold Preservation. *Ann Thorac Surg* 63(6): 1556-61.
- BOASQUEVISQUE, C. H., MORA, B. N., BOGLIONE, M., RITTER, J. K., SCHEULE, R. K., YEW, N., DEBRUYNE, L., QIN, L., BROMBERG, J. S., and PATTERSON, G. A., 1999. Liposome-Mediated Gene Transfer in Rat Lung Transplantation: a Comparison Between the *in Vivo* and *ex Vivo* Approaches. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117(1): 8-15.
- BOEHLER, A., CHAMBERLAIN, D., KESTEN, S., SLUTSKY, A. S., LIU, M., and KESHAVJEE, S., 1997. Lymphocytic Airway Infiltration As a Precursor to Fibrous Obliteration in a Rat Model of Bronchiolitis Obliterans. *Transplantation* 64(2): 311-17.
- BOEHLER, A., BAI, X-H., LIU, M., CASSIVI, S., CHAMBERLAIN, D., SLUTSKY, A. S., and KESHAVJEE, S., 1999. Upregulation of T-helper 1 cytokines and

chemokine expression in post-transplant airway obliteration. *Am J Resp Crit Care Med* 159(6): 1910-17

BOEHLER, A., CHAMBERLAIN, D., XING, Z., SLUTSKY, A. S., JORDANA, M., GAULDIE, J., LIU, M., and KESHAVJEE, S., 1998. Adenovirus-Mediated Interleukin-10 Gene Transfer Inhibits Posttransplant Fibrous Airway Obliteration in an Animal Model of Bronchiolitis Obliterans. *Hum Gene Ther* 9(4): 541-51.

BOLMAN III, R. M., 1998. Intracoronary Adenovirus-Mediated Transfer of Immunosuppressive Cytokine Genes Prolongs Allograft Survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115(4): 819-21.

BORGER, P., KAUFFMAN, H. F., TIMMERMAN, J. A., SCHOLMA, J., VAN DER BERG, J. W., and KOETER, G. H., 2000. Cyclosporine, FK506, Mycophenolate Mofetil, and Prednisolone Differentially Modulate Cytokine Gene Expression in Human Airway-Derived Epithelial Cells. *Transplantation* 69(7):1408-13.

BRADFORD, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

BRAUNER, R., NONOYAMA, M., LAKS, H., DRINKWATER, D. C., McCAFFERY, S., DRAKE, T., BERK, A., SEM, L., WU, L., 1997. Intracoronary Adenovirus-Mediated Transfer of Immunosuppressive Cytokine Genes Prolongs Allograft Survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114(6): 923-33.

BYRNES, A. P., RUSBY, J. E., WOOD, M. J. A., and CHARLTON, H. M., 1995. Adenovirus Gene Transfer Causes Inflammation in the Brain. *Neuroscience* 66(4): 1015-24.

CAMARGO, J. J. P., 1991. Transplante de Pulmão. In *Compêndio de Pneumologia*. 2^a edição. Fundo Editorial BYK. São Paulo.

CARTMELL, T., SOUTHGATE, T., REES, G. S., CASTRO, M. G., LOWESTEIN, P. R., and LUHESHI, G. N., 1999. Interleukin-1 Mediates a Rapid Inflammatory Response After Injection of Adenovirus Vectors into the Brain. *J Neurosci* 19(4): 1517-23.

CASSATELLA, M. A., MEDA, L., BONORA, S., CESKA, M., and CONSTANTIN, G., 1993. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits the Release of Proinflammatory Cytokines from Human Polymorphonuclear Leukocytes. Evidence for an Autocrine Role of Tumor Necrosis Factor and IL-1 β in Mediating the Production of IL-8 Triggered by Lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178: 2207-11.

CASSIVI, S. D., LIU, M., PIERRE, A., BOEHLER, A., TANSWELL, A. K., SLUTSKY, A. S., and KESHAVJEE, S., 2000. Transplant Immunosuppression Increases and Prolongs Transgene Expression in Adenovirus-Mediated Transfection of Rat Lungs. *J Heart Lung Transplant* 19(10): 984-94.

CASSIVI, S.D., LIU, M., BOEHLER, A., TANSWELL, A. K., SLUTSKY, A. S., KESHAVJEE, S., and TODD, S., 1999. Transgene Expression After Adenovirus-Mediated Retransfection of Rat Lungs Is Increased and Prolonged by Transplant Immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117(1): 1-7.

CASSIVI, S., CARDELLA, J. A., FISCHER, S., SLUTSKY, A. S., LIU, M., and KESHAVJEE, S., 1999. Transtracheal gene transfection of donor lungs prior to organ procurement increases transgene levels at reperfusion and following transplantation. *J Heart Lung Transplant* 18(12): 1181-8.

CHANG, D. M., HSU, K., DING, Y. A., and CHIANG, C. H., 1997. Interleukin-1 in Ischemia-Reperfusion Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1230-34.

- CHIRMULE, N., TRUNEH, A., HAECKER, S. E., TAZELAAR, J., GAO, G., RAPER, S. E., HIGHERS, J. V., and WILSON, J. M., 1999. Repeated Administration of Adenoviral Vectors in Lungs of Human CD4 Transgenic Mice Treated with a Nondepleting CD4 Antibody. *J Immunol* 163(1):448-55.
- CHOW, Y., PLUMB, J., WEN, Y., STEER, B. M., LU, Z., BUCHWALD, M., and HU, J., 2000. Targeting Transgene Expression to Airway Epithelia and Submucosal Glands, Prominent Sites of Human CFTR Expression. *Mol Ther* 2(4): 359-67.
- CHUM, S., DAHESHIA, M., LEE, S., and ROUSE, B.T., 1999. Immune Modulation by IL-10 Gene Transfer via Viral Vector and Plasmid DNA: Implication for Gene Therapy. *Cel Immunol* 194: 194-204.
- CIPOLLA, D. C., GONDA, I., SHAK, S., KOVESDI, I., CRYSTAL, R., and SWEENEY, T. D., 2000. Coarse Spray Delivery to a Localized Region of the Pulmonary Airways for Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 11: 361-71.
- COLLETTI, L. M., REMICK, D. G., BURTCH, G. D., KUNKEL, S. L., STRIETER, R. M., and CAMPBELL JR., D. A., 1990. Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathophysiologic Alterations after Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat. *J Clin Invest* 85(6): 1936-43.
- COOPER, J. D. & VREIM, C. E., 1992. Biology of Lung Preservation for Transplantation. *Am Rev Respir Dis* 146: 803-7.
- CSETE, M.E., DRAZAN, K. E., VAN BREE, M., McINTEE, D. F., McBRIDE, W. H., BETT, A., GRAHAM, F. L., BUSUTTIL, R. W., BERK, A. J., and SHAKED, A., 1994. Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. I. Conditions for expression of transferred genes in cold-preserved hepatocytes. *Transplantation* 57(10): 1502-07.
- CURIEL, D. T., PILEWSKI, J. M., and ALBELDA, S. M., 1996. Gene Therapy Approaches For Inherited and Acquired Lung Diseases. *Am J Resp Crit Care Med* 14: 1-18.

- DAEMEN, M.A., VANT VEER, C., DENECKER, G., HEEMSKERK, V. H., WOLFS, T.G., CLAUSS, M., VANDENABEELE, P., and BUURMAN; W. A., 1999. Inhibition of Apoptosis Induced by Ischemia-reperfusion Prevents Inflammation. *J Clin Invest* 104: 541-49.
- DAEMEN, M.A., VAN DE VEN, M., HEINEMAN, E., and BUURMAN; W. A., 1999. Involvement of Endogenous Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 67(6): 792-800.
- DAGGET, C. W., YEATMAN, M., LODGE. A. J., CHEN, E. P., LINN, S. S., GULLOTTO, C., FRANK, M. M., PLATT, J. L., DAVIS, R. D., and UNGERLEIDER, R. M., 1998. Total respiratory support from swine lungs in primate recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115(1): 19-27.
- D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N. M., MA, X., KUBIN, M., and TRINCHIERI, G., 1993. Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178(3): 1041-48.
- DATE, H., MATSUMARA, A., MANCHESTER, J. K., OBO, H., LIMA, O., and COOPER, J. M., 1993. Evaluation of Lung Metabolism During Successful Twenty-Four-Hour Canine Lung Preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105(3): 480-91.
- De CAMPOS, K.N., KESHAVJEE, S., LIU, M., and SLUTSKY, A. S., 1998. Optimal Inflation Volume for Hypothermic Preservation of Rat Lungs. *J Heart Lung Transplant* 17(6): 599-607.
- De CAMPOS, K. N., KESHAVJEE, S., LIU, M., and SLUTSKY, A. S., 1998. Prevention of Rapid Reperfusion-Induced Lung Injury with Prostaglandin E1 During the Initial Period of Reperfusion. *J Heart Lung Transplant* 17(11): 1121-28.

- De CAMPOS, K. N., KESHAVJEE, S., SLUTSKY, A. S., and LIU, M., 1999. Alveolar Recruitment Prevents Rapid Reperfusion-Induced Injury of Lung Transplants. *J Heart Lung Transplant* 18(11): 1096-102.
- DEMIKHOV, V. P., 1969. [Transplantation of the Heart, Lungs, and Other Organs]. *Eksp Khir Anesteziol* 14: 3-8.
- DENHAM, W., DENHAM, D., YANG, J., CARTER, G., MacKAY, S., MOLDAWER, L. L., CAREY, L. C., and NORMAN, J., 1998. A Novel Cytokine Regulatory Strategy for Experimental Pancreatitis. *Ann Surg* 227(6): 812-20.
- De PERROT, M., FISCHER, S., LIU, M., JIN, R., BAI, X-H., WADDELL, T. K., KESHAVJEE, S., 2001. Prostaglandin E1 Protects Lung Transplants from Ischemia-Reperfusion Injury: A Shift from Pro- To Anti-inflammatory Cytokines. *Transplantation* 72(9): 1505-11.
- De PERROT, M., SEKINE, Y., FISCHER, S., WADDELL, T. K., McRAE, K., LIU, M., WIGLE, D. A., and KESHAVJEE, S., 2002. Interleukin-8 Release During Early Reperfusion Predicts Graft Function in Human Lung Transplantation. *Am J Respir Care Med* 165(2): 211-5.
- De WAAL MALEFYT, R., HAANEN, J., SPITS, H., RONCAROLO, M-G., te VELDE, A., FIGDOR, C., JOHNSON, K., KASTELEIN, R., YSSEL, H., and de VRIES J. E., 1991. Interleukin-10 (IL-10) and Viral IL-10 Strongly Reduce Antigen-Specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen-Presenting Capacity of Monocytes via Downregulation of ClassII Major Histocompatibility Complex Expression. *J Exp Med* 174: 915-24.
- De WAAL MALEFYT, R., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C. G., and de VRIES J. E., 1991. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis By Human Monocytes: An Autoregulation Role of Il-10 Produced By Monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-20.

- De WAAL MALEFYT, R., YSSEL, H., and de VRIES J. E., 1993. Direct Effects of IL-10 on Subsets of Human CD4⁺ T Cell Clones and Resting T Cells. *J Immunol* 150(11): 4754-65.
- DINARELLO, C. A. & MIER, J. W., 1987. Lymphokines. *N Engl J Med* 15: 940-5.
- DING, L., LINSLEY, P. S., HUANG, L-Y., GERMAIN, R. N., and SHEVACH, E. M., 1993. IL-10 Inhibits Macrophage Costimulatory Activity by Selectively Inhibiting the Up-Regulation of B7 Expression. *J Immunol* 151(3): 1224-34.
- DONNELLY, S. C., STRIETER, R. M., KUNKEL, S. L., WALZ, A., ROBERTSON, C. R., and CARTER, D. C., 1993. Interleukin-8 and Development of Adult Respiratory Distress Syndrome in At-Risk Patient Groups. *Lancet* 341: 643-47.
- D'OIDIO, F., YANO, M., RITTER, J. H., MOHANAKUMAR, T., PATTERSON, G. A., 1999. Endobronchial Transfection of Naked TGF- β 1 cDNA Attenuates Acute Lung Rejection. *Ann Thorac Surg* 68(3): 1008-13.
- EGAN, T. M., BOYCHUK, J. E., ROSATO, K., and COOPER, J. D., 1992. Whence the lungs? A study to assess suitability of donor lungs for transplantation. *Transplantation* 53: 420-2.
- EISING, G. P., SCHAD, H., HEIMISCH, W., CIPPNER-STEPPERT, C., JOCHUM, M., BROWN, S. L., MENDLER, N., MEISNER, H., and LANGE, R., 2000. Effect of Cardiopulmonary Bypass and Hemofiltration on Plasma Cytokines and Protein Leakage in Pigs. *Thorac Cardiovasc Surg* 48: 86-92.
- EL-GAMEL, A., SIM, E., HASLETON, P., HUTCHINSON, J., YONAN, N., EGAN, J., CAMPBELL, C., RAHMAN, A., SHELDON, S., DEIRANIYA, A., and HUTCHINSON, I. V., 1999. Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) and Obliterative Bronchiolitis Following Pulmonary Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 18: 828-37.

- ELKON, K. B., LIU, C-C., GALL, J. G., TREVEJO, J., MARINO, M. W., ABRAHAMSEN, K. A., SONG, X., ZHOU, J-L., OLD, L. J., CRYSTAL, R. G., and FALCK-PEDERSEN, E., 1997. Tumor Necrosis Factor α Plays a Central Role in Immune-Mediated Clearance of Adenoviral Vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9814-9.
- ELSSNER, A., JAUMANN, F., DOBMANN, S., BEHR, J., SCHWAIBLMAIR, M., REICHENSPURNER, H., FÜRST, H., BRIEGEL, J., and VOGELMEIER, C., 2000. Elevated Levels of Interleukin-8 and Transforming Growth Factor-Beta in Bronchoalveolar Lavage Fluid From Patients with Bronchiolitis Obliterans Syndrome: Proinflammatory Role of Bronchial Epithelial Cells. *Transplantation* 70: 362-67.
- EPPINGER, M. J., WARD, P. A., JONES, M. L., BOLLING, S. F., and DEEB, G. M., 1995. Disparate Effects of Nitric Oxide on Lung Ischemia-reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 60: 1169-75.
- EPPINGER, M. J., WARD, P. A., BOLLING, S. F., and DEEB, G.M., 1996. Regulatory Effects of Interleukin-10 on Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112(5): 1301-05.
- EPPINGER, M. J., DEEB, G. M., BOLLING, S.F., and WARD, P. A., 1997. Mediators of Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Lung. *Am J Pathol* 150(5): 1773-84.
- FABREGA, A. J., FASBENDER, A. J., STRUBLE, S., and ZABNER, J., 1996. Cationic Lipid-Mediated Transfer of the hIL-10 Gene Prolongs Survival of Allogeneic Hepatocytes in Nagase Analbuminemic Rats. *Transplantation* 62(12): 1866-71.
- FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. M., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M., and DANIELSON, M., 1987. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21):7413-7

- FINKELMAN, F. D., MADDEN, K. B., MORRIS, S. C., HOLMES, J. M., BOIANI, N., KATONA, I. M., MALISZEWSKI, C. R., 1993. Anti-Cytokine Antibodies as Carrier Proteins. Prolongation of *in Vivo* Effects of Exogenous Cytokines by Injection of Cytokine-Anti Cytokine Antibodies Complexes. *J Immunol* 151(3): 1235-44.
- FISCHER, S., MacLEAN, A. A., LIU, M., CARDELLA, J. A., SLUTSKY, A. S., SUGA, M., MOREIRA, J. F., and KESHAVJEE, S., 2000. Dynamic Changes in Apoptotic and Necrotic Cell Death Correlate with Severity of Ischemia-reperfusion Injury in Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 162(5): 1932-9.
- FISCHER, S., LIU, M., MacLEAN, A. A., De PERROT, M., HO, M., and CARDELLA, J. A., 2001. In Vivo Transtracheal Adenovirus-Mediated Transfer of Human IL-10 Gene to Donor Lungs Ameliorates Ischemia-Reperfusion Injury and Improves Early Posttransplant Graft Function in the Rat. *Hum Gene Ther* 12: 1513-26.
- FRANGOIANNIS, N. G., YOUKER, K. A., ROSSEN, R. D., GWECHENBERGER, M., LINDSEY, M. H., and MENDONZA, L. H., 1998. Cytokines and the Microcirculation in Ischemia and Reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2567-76.
- FRANGOIANNIS, N. G., MENDONZA, L. H., LINDSEY, M. L., BALLANTINE, C. M., MICHAEL, L. H., and SMITH, C. W., 2000. IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *J Immunol* 165: 2798-808.
- FREIMARK, B. D., BLEZINGER, H. P., FLORACK, V. J., NORDSTROM, J. L., LONG, S. D., DESHPANDE, D. S., NOCHUMSON, S., and PETRAK, K. L., 1998. Cationic Lipids Enhance Cytokine and Cell Influx Levels in the Lung Following Administration of Plasmid: Cationic Lipid Complexes. *J Immunol* 160: 4580-6.

- GAMMIE, J. S., STUKUS, D. R., PHAM, S. M., HATTLER, B. G., McGRATH, M. F., McCURRY, K. R., GRIFFITH, B. P., and KEENAN, R. J., 1999. Effect of Ischemic Time on Survival in Clinical Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg* 68(6): 2015-20.
- GAUTAM, A., DENSMORE, C. L., XU, B., and WALDREP, J. C., 2000. Enhanced Gene Expression in Mouse Lung after PEI-DNA Aerosol Delivery. *Mol Ther* 2(1): 63-70.
- GEERTSMAA, A., TEN VERGERT, E. M., BONSEL, G. J., DE BOER, W. J., and VAN DER BIJ, W., 1998. Does lung transplantation prolong life? A comparison of survival with and without transplantation. *J Heart Lung Transplant* 17: 511-6.
- GEISSLER, E. K., KORZUN, W. J., and GRAEB, C., 1997. Secreted Donor-MHC Class I Antigen Prolongs Liver Allograft Survival and Inhibits Recipient Anti-Donor Cytotoxic T Lymphocyte Responses. *Transplantation* 64(5): 782-6.
- GERDES, C. A., CASTRO, M. G., and LOWESTEIN, P. R., 2000. Strong Promoters Are the Key to Highly Efficient, Noninflammatory and Noncytotoxic Adenoviral-Mediated Transgene Delivery into the Brain *in Vivo*. *Mol Ther* 2(4): 330-8.
- GILBERT, S. P. & JONHSON, K. A., 1994. Pre-steady-state Kinetics of the microtubule-kinesin ATPase. *Biochemistry* 33, 1951-60.
- GILLIARD, N., RICHMAN, P. M., MERRITT, T. A., and SPRAGG, R. G., 1990. Effect of Volume and Dose on the Pulmonary Distribution of Exogenous Surfactant Administered to Normal Rabbits or to Rabbits with oleic Acid Lung Injury. *Am Rev Respir Dis* 141: 743-7.
- GOLDMAN, M. J., LITZKY, L. A., ENGELHARDT, J. F., and WILSON, J. M., 1995. Transfer of the CFTR Gene to the Lung of Nonhuman Primates with E1-

Deleted, E2a-Defective Recombinant Adenoviruses: A Preclinical Toxicology Study. *Hum Gene Ther* 6: 839-51.

GOTTLIEB, R. A., BURLESON, K. O., KLONER, R. A., BABIOR, B. M., and ENGLER, R. L., 1994 Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94(4): 1621-28.

GRAHAM, F. L. & PREVEC, L., 1995. Methods for Construction of Adenovirus Vectors. *Mol Biotechnol* 3: 207-20.

GUDMUNDSSON, G., BOSCH, A. DAVIDSON, B. L., BERG, D. J., and HUNNINGHAKE, G. W., 1998. Interleukin-10 Modulates the Severity of Hyper sensitivity Pneumonitis in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19; 812-8.

HAGIMOTO, N., KUWANO, K., KAWASAKI, M., YOSHIMI, M., KANAKO, Y., KUNITAKE, R., MAEYAMA, T., TANAKA, T., and HARA, N., 1999. Induction of Interleukin-8 Secretion and Apoptosis in Bronchiolar Epithelial Cells by Fas Ligation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 436-45.

HALBERT, C. L., STANDAERT, T. A., AITKEN, M., ALEXANDER, I. E., RUSSELL, D. W., and MILLER, A. D., 1997. Transduction by Adeno-Associated Virus Vectors in the Rabbit Airway: Efficiency, Persistence, and Readministration. *J Virol* 71: 5932-41.

HARDY, J. D., WEBB, W. R., DALTON, M. L., and WALKER, G. R., 1963. Lung Homotransplantation in man. *JAMA* 186: 1065-74.

HARROD, K. S., HERMISTON, T. W., TRAPNELL, B.C., WOLD, W. S. M., and WHITSETT, J. A., 1998. Lung-Specific Expression of Adenovirus E3-14.7K in Transgenic Mice Attenuates Vector-Mediated Lung Inflammation and Enhances Transgene Expression. *Hum Gene Ther* 9: 1885-98.

- HARROD, K. S., MOUNDAY, A. D., and WHITSETT, J. A., 2000. Adenoviral E3-14.7K Protein in LPS-Induced Lung Inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: 631-39.
- HASEGAWA, T., IACONO, A. T., and YOUSEM, S. A., 2000. The Anatomic Distribution of Acute Cellular Rejection in the Allograft Lung. *Ann Thorac Surg* 69: 1529-31.
- HASLETON, P. S. & DORAN, H. M. Pulmonary changes after transplantation. P.S. Hasleton. *Spencer's Pathology of the Lung*. McGraw-Hil, New York, 1996: 723-65.
- HAVERICH, A., AZIZ, S., SCOTT, W.C., JAMIESON, S. W., and SHUMWAY, N. E., 1986. Improved Lung Preservation Using Euro-Collins Solution for Flush-Perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 34: 368-76
- HAYWARD, R., NOSSULI, T. O., SCALIA, R., and LEFER, A. M., 1997. Cardioprotective Effect of Interleukin-10 in Murine Myocardial Ischemia-Reperfusion. *Eur J Pharmacol*. Sep 10;334(2-3):157-63.
- HESS, P. J., SEEGER, J. M., HUBER, T. S., WELBORN, M. B., MARTIN, T. D., HARWARD, T. R., DUSCHEK, S., EDWARDS, P. D., SOLORZANO, C. C., COPELAND, E. M., and MOLDAWER, L. L., 1997. Exogenously administered interleukin-10 decreases pulmonary neutrophil infiltration in a tumor necrosis factor-dependent murine model of acute visceral ischemia *J Vasc Surg* 26(1): 113-18.
- HIBI, M., NAKAJIMA, K., and HIRANO, T., 1996. IL-6 Cytokine Family and Signal Transduction: A model of Cytokine System. *J Mol Med* 1996 74(1):1-12.
- HIRANO, T., 1998. Interleukin 6, in *The Cytokine Handbook*, 3rd Ed. Academic Press, New York, NY. P. 197.

- HIRATSUKA, M., MORA, B.N., YANO, M., MOHANAKUMAR, T., and PATTERSON, G. A., 1999. Gene Transfer of Heat Shock Protein 70 Protects Lungs Grafts From Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 67(5): 1421-7.
- HOFFMAN, M., 1994, New Vector Delivers Genes to Lung Cells. *Science* 252: 374.
- HOFMAN, F. M., CHEN, P., JEYASEELAN, R., INCARDONA, F., FISHER, M., and ZIDOVETZKI, R., 1998. Endothelin-1 Induces Production of the Neutrophil Chemotatic Factor Interleukin-8 by Human Brain-Derived Endothelial Cells. *Blood* 92(9): 3064-72.
- HOSENPUD, D. J., BENNETT, L. E., KECK, B. M., FIOL, B., BOUCEK, M. M., NOVICK, R. J., 1998. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Fifteenth Official Report—1998. *J Heart Lung Transplant* 17(7): 656-68.
- HOSENPUD, D. J., BENNETT, L. E., KECK, B. M., FIOL, B., BOUCEK, M. M., NOVICK, R. J., 1999. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Sixteenth Official Report—1999. *J Heart Lung Transplant* 18(7): 611-26.
- HOSENPUD, D. J., BENNETT, L. E., KECK, B. M., BOUCEK, M. M., NOVICK, R. J., 2000. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Sixteenth Official Report—2000. . *J Heart Lung Transplant* 19(10): 909-31.
- HOWARD, M. & O’GARRA, A., 1992. Biological Properties of Interleukin 10. *Immunol Today* 13: 198-200.
- HUMBERT, M., DELATTRE, R. M., FATTAL, S., RAIN, B., CERRINA, J., DARTEVELLE, P., SIMONNEAU, G., DUROUX, P., GALANAUD, P., EMILIE, D., 1993. In Situ Production of Interleukin-6 within Human Lung

Allografts Displaying Rejection or Cytomegalovirus Pneumonia. *Transplantation*. 56(3):623-7.

HUTCHINS, B., SAJJADI, N., SEAVER, S., SHEPHERD, A., BAUER, S. R., SIMEK, S., CARSON, K., and AGUILAR-CORDOVA, E., 2000. Working Toward an Adenoviral Vector Testing Standard. *Mol Ther* 2(6): 532-4.

IACONO, A., DAUBER, J., KEENANA, R., SPICHTY, K., CAI, J., GRGURICH, W., BURCKART, G., SMALDONE, G., PHAM, S., OHORI, S., YOUSEM, S., WILLIAMS, P., GRIFFITH, B., and ZEEVI, A., 1997. Interleukin-6 and Interferon- γ Gene Expression in Lung Transplant Recipients with Refractory Acute Cellular Rejection. *Transplantation* 64(2): 263-69.

ILAN, Y., DROGUETT, G., CHOWDHURY, N. R., LI, Y., SENGUPTA, K., THUMMALA, N., DAVIDSON, A., CHOWDHURY, J. R., and HORWITZ, M. S., 1997. Insertion of the Adenoviral E3 Region into a Recombinant Viral Vector Prevents Antiviral Humoral and Cellular Immune Responses and Permits Long-Term Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2587-92.

ISOWA, N., XAVIER, A. M., DZIAK, E., OPAS, M., McRITCHIE, D. I., SLUTSKY, A. S., KESHAVJEE, S., and LIU, M., 1999. LPS-Induced Depolymerization of Cytoskeleton and Its Role in TNF- α Production by Rat Pneumocytes. *Am J Physiol* 277: L606-15.

ITANO, H., ZHANG, W., RITTER, J. H., McCARTHY, T. J., MOHANAKUMAR, T., and PATTERSON, G. A., 2000. Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Human Interleukin-10 Ameliorates Reperfusion Injury of Rat Lung Isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120(5): 947-56.

ITANO, H., MORA, B. N., ZHANG, W., RITTER, J. H., McCARTHY, T. J., YEM, N. S., MOHANAKUMAR, T., and PATTERSON, G. A., 2001. Lipid-Mediated

ex Vivo Gene Transfer of Viral Interleukin 10 in Rat Lung Allograft Transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122(1): 29-38.

ITANO, H., ZHANG, W., RITTER, J. H., McCARTHY, T. J., YEM, N. S., MOHANAKUMAR, T., and PATTERSON, G. A., 2001. Endobronchial Transfection of Naked Viral Interleukin-10 Gene in Rat Lung Allograft Transplantation. *Ann Thorac Surg* 71(4): 1126-33.

JACKSON, A., PALMER, S., DAVIS, R. D., PAPPENDICK, A., PEARSON, E., SAVIK, K., ORMAZA, S., HERTZ, M., DACEY, M., MILLER, L., and REINSMOEN, N. L. 2001. Cytokine Genotypes in Kidney, Heart, and Lung Recipients: Consequences for Acute and Chronic Rejection. *Transplant Proc* 33: 489-90.

JEPPSSON, A., LEE, R., PELLEGRINI, C., O'BRIEN, T., TAZELAAR, H. D., and MCGREGOR, C. G., 1998. Gene Therapy in Lung Transplantation: Effective Gene Transfer Via the Airways. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115(3): 638-43.

JOBE, A. H., IKEGAMI, M., YEI, S., WHITSETT, J. A., and TRAPNELL, B., 1996. Surfactant Effects on Aerosolized and Instilled Adenoviral-Mediated Gene Transfer. *Hum Gene Ther* 7: 697-704.

JUDGE, T. A., DESAI, N. M., YANG, Z., ROSTAMI, S., ALONSO, L., ZHANG, H., CHEN, Y., MARKMAN, J. F., DeMATEO, R. P., BARKER, C. F., NAJI, A., and TURKA, L. A., 1998. Utility of Adenoviral-Mediated Fas Ligand Gene Transfer to Modulate Islet Allograft Survival. *Transplantation* 66(4): 426-34.

KAISER, L. R. & ALBELDA, S. M., 1997. Gene Transfer and Thoracic Surgery: More to Come. *Ann Thorac Surg* 63(6): 1527-8.

KANAAN, S. A., SUDA, T., KOZOWER, B. D., DADDI, N., TAGAWA, T., and PATTERSON, G. A., 2001. Intratracheal Adenovirus Mediated Gene Transfer

Is the Optimal Delivery Route For Use in Experimental Lung Transplantation. Surg Forum, in press.

KAPLAN, J. M., ARMENTANO, D., SPARER, T. E., WYNN, S. G., PETERSON, P. A., WADSWORTH, S. C., COUTURE, K. K., PENNINGTON, S. E., ST. GEORGE, J. A., GOODING, L. R., and SMITH, A. E., 1997. Characterization of Factors Involved in Modulating Persistence of Transgene Expression from Recombinant Adenovirus in the Mouse Lung. *Hum Gene Ther* 8: 45-56.

KAPLAN, J. M., PENNINGTON, S. E., ST. GEORGE, J. A., WOODWORTH, L. A., FASBENDER, A., MARSHALL, J., CHENG, S. H., WADSWORTH, S. C., GREGRY, R. J., and SMITH, A. E., 1998. Potentiation of Gene Transfer to the Mouse Lung by Complexes of Adenovirus Vector and Polycations Improves Therapeutic Potential. *Hum Gene Ther* 9: 1469-79.

KATKIN, J. P., HUSSER, R. C., LANGSTON, C., and WELTY, S. E., 1997. Exogenous Surfactant Enhances the Delivery of Recombinant Adenoviral Vectors to the Lung. *Hum Gene Ther* 8: 171-85.

KAY, M. A., GLORIOSO, J. C., and NALDINI, L., 2001. Viral Vectors for Gene Therapy: The Art of Turning Infectious Agents into Vehicles of Therapeutics. *Nature Medicine* 7(1): 33-40.

KESHAVJEE, S., YAMAZAKI, F., YOKOMISE, H., CARDOSO, P. F., MULLEN, J. B. M., SLUTSKY, A. S., and PATTERSON, G. A., 1992. The Role of Dextran 40 and Potassium in Extended Hypothermic Lung Preservation for Transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103(2): 314-25.

KHIMENKO, P. L., BAGBY, G. J., FUSELER, J., and TAYLOR, A. E., 1998. Tumor Necrosis Factor- alpha in Ischemia and Reperfusion Injury. *J Appl Physiol* 85: 2005-11.

- KINGSTON, P. A., SINHA, S., DAVID, A. CASTRO, M. G., LOWENSTEIN, P. R., and HEAGERTY, A. M., 2001. Adenoviral-Mediated Gene Transfer of a Secreted Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Inhibits Luminal Loss and Constrictive Remodeling after Coronary Angioplasty and Enhances Adventitial Collagen Deposition. *Circulation* 104: 2595-601.
- KIRK, A. J., COLQUHOUN, I. W., and DARK, J. H., 1993. Lung Preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg* 56: 990-1000.
- KITCHING, A. R., TIPPING, P. G., TIMOSHANKO, J. R., and HOLDSWORTH, S. R., 2000. Endogenous Interleukin-10 Regulates Th1 Responses That Induce Crescentic Glomerulonephritis. *Kidney Int* 57(2): 518-25.
- KLUTH, D. C., AINSLIE, C. V., PEARCE, W. P., FINLAY, S., CLARKE, D., ANEGON, I., and REES, A. J., 2001. Macrophages Transfected with Adenovirus to Express IL-4 Reduce Inflammation in Experimental Glomerulonephritis. *J Immunol* 166:4728-36.
- KOHLI, V., SELZNER, M., MADDEN, J. F., BENTLEY, R. C., and CLAVIEN, P. A., 2000. Endothelial Cell and Apoptosis after Ischemia-reperfusion Injury in the Rat Liver. *Transplantation* 67: 1099-105.
- KOOLS, J. K., LEI, D., ODOM, G., NELSON, S., SUMMER, W. R., GERBER, M. A., and SHELLITO, J. E., 1996. Use of Transient CD4 Lymphocyte Depletion to Prolong Transgene Expression of E1-Deleted Adenoviral Vectors. *Hum Gene Ther* 7: 489-97.
- KORST, R. J., BEWIG, B., and CRYSTAL, R. G., 1995. *In Vitro* and *in Vivo* Transfer and Expression of Human Surfactant SP-A- and SP-B-Associated Protein cDNAs Mediated by Replication-Deficient, Recombinant Adenoviral Vectors. *Hum Gene Ther* 6: 277-87.

- KRAKAUER, T., 2002. Stimulant-Dependent Modulation of Cytokines and Chemokines by Airway Epithelial Cells: Cross Talk between Pulmonary Epithelial and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(1): 126-31.
- KÜHN, R., LÖHLER, J., RENNICK, D., RAJEWSKI, K., MÜLLER, W., 1993. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* 75: 263-74.
- LANE, J. S., TODD, K. E., LEWIS, P., GLOOR, B., ASHLEY, S. W., REBER, H. A., McFADDEN, D. W., and CHANDLER, C. F., 1997. Interleukin-10 Reduces the Systemic Inflammatory Response in a Murine Model of Intestinal Ischemia/Reperfusion. *Surgery* 122(2): 288-94.
- LAU, C. L., PALMER, S. M., POSTHER, K. E., HOWELL, D. N., REINSMOEN, N. L., MASSEY, T., TAPSON, V.F., JAGGERS, J. J., D'AMICO, T. A., and DAVIS, R. D., 2000. Influence of Panel-Reactive Antibodies on Posttransplant Outcomes in Lung Transplant Recipients. *Ann Thorac Surg* 69(5): 1520-4.
- LAUBE, B. L., LINKS, J. M., LaFRANCE, N. D., WAGNER, H. N., ROSENSTEIN, B. J., 1989. Homogeneity of Bronchopulmonary Distribution of ^{99m}Tc Aerosol in Normal Subjects and in Cystic Fibrosis Patients. *Chest* 95(4): 822-9.
- Le MOINE, O., LOUIS, H., STORDEUR, P., COLLET, J-M., GOLDMAN, M., and DEVIÈRE, J., 1997. Role of Reactive Oxygen Intermediates in Interleukin 10 Release After Cold Liver Ischemia and Reperfusion in Mice. *Gastroenterology* 113: 1701-6.
- LENTSCH, A. B., YOSHIDOME, H., CHEADLE, W. G., MILLER, F. N., and EDWARDS, M. J., 1998. Chemokine Involvement in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Hepatology* 27: 507-12.
- LENTSCH, A. B., YOSHIDOME, H., KATO, A., WARNER, R.L., CHEADLE, W. G., and WARD, P. A., 1999. Requirement for Interleukin-12 in the Pathogenesis

- of Warm Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Hepatology* 30: 1448-53.
- LI, C., CORRALIZA, I., and LANGHORNE, J., 1999. A Defect in Interleukin-10 Leads to Enhanced Malarial Disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infection in Mice. *Infect Immun* 67(9): 4435-42.
- LI, W., FU, F., LU, L., NARULA, S. K., FUNG, J. J., THOMSON, A. W., and QIAN, S., 1999. Recipient Pretreatment with Mammalian IL-10 Prolongs Mouse Cardiac Allograft Survival by Inhibition of Anti-Donor T Cell Response. *Transplant Proc* 31(1-2):115.
- LIU, M., & SLUTSKY, A. S., 1997. Anti-inflammatory therapies: Application of molecular biology techniques in intensive care medicine. *Intensive Care Medicine* 23(7): 718-31.
- LIU, M., TREMBLAY, L., CASSIVI, S. D., BAI, X-H., MOURGEON, E., PIERRE, A. F., SLUTSKY, A. S., POST, M., and KESHAVJEE, S., 2000. Alterations of nitric oxide synthases expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(5): 1071-81.
- LOZIER, J. N., CSAKO, G., MONDORO, T. H., KRIZEK, D. M., METZGER, M. E., COSTELLO, R., VOSTAL, J. G., RICK, M. E., DONAHUE, R. E., and MORGAN, R. A., 2002. Toxicity of a First-Generation Adenoviral Vector in Rhesus Macaques. *Hum Gene Ther* 13: 113-24.
- MAGNAN, A., MEGE, J. L., REYNARD, M., THOMAS, P., CAPO, C., GARBE, L., MERIC, B., BADIER, M., BONGRAND, P., and VIARD, L., 1994. Monitoring of Alveolar Macrophage Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-6 in Lung Transplant Recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med* 150(3): 684-9.
- MÄKELÄ, M. J., KANEHIRO, A., BORISH, L., DAKHAMA, A., LOADER, J., JOETHAM, A., XING, Z., JORDANA, M., LARSEN, G. L., and GELFAND,

- W., 2000. IL-10 Is Necessary for the Expression of Airway Hyperresponsiveness But Not Pulmonary Inflammation After Allergic Sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11): 6007-12.
- MAL, H., DEHOUX, M., SLEIMAN, C., BOCZKOWSKI, J., LESÈCHE, G., PARIENTE, R., and FOURNIER, M., 1996. Early Release of Proinflammatory Cytokines After Lung Transplantation. *Chest* 113(3): 645-51.
- MANNINO, R. J. & GOULD-FOGERITE, S., 1988. Liposome Mediated Gene Transfer. *Biotechniques* 6(7):682-90.
- McBRIDE, S., RANNIE, D., and HARRISON, D. J., 2000. Gene Transfer to Adult Human Lung Tissue *ex Vivo*. *Gene Ther* 7(8): 675-9.
- McDONALD, R. J., LUKASON, M. J., RAABE, O. G., CANFIELD, D. R., BURR, E. A., KAPLAN, J. M., WADSWORTH, S. C., and ST. GEORGE, J. A., 1997. Safety of Airway Gene Transfer with Ad2/CFTR2: Aerosol Administration in the Nonhuman Primate. *Hum Gene Ther* 8: 411-22.
- MEDINA-PESTANA, J. O., VAZ, M. L. S., and PARK, S. I., 2002. Organ Transplant in Brazil. *Transplant Proc* 34: 441-3.
- METRAS D., 1992. HENRI METRAS: A Pioneer in Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant*. 11:1213-15.
- MESHALKIN, E. N., AL'PERIN, L. I., 1969. [Long-term Results of Intrathoracic Surgery for Bronchial Asthma]. *Klin Khir* 11: 29-32.
- MILLER, D. G., ADAM, M. A., and MILLER, A. D., 1990. Gene Transfer by Retrovirus Vectors Occurs Only in Cells That Are Actively Replicating at the Time of Infection. *Mol Cell Biol* 10: 4239-42.

- MILLER, E. J., COHEN, A. B., and MATTHAY, M. A., 1996. Increased Interleukin-8 Concentrations in the Pulmonary Edema Fluid of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome From Sepsis. *Crit Care Med* 24: 1448-54.
- MINTER, R. M., RECTENWALD, J. E., FUKUZUKA, K., TANAHILL, C. L., La FACE, D., TSAI, V., AHMED, I., HUTCHINS, E., MOYER, R., COPELAND III, E. M., and MOLDAWER, L. L., 2000. TNF- α Receptor Signaling and IL-10 Gene Therapy Regulate the Innate and Humoral Immune Responses to Recombinant Adenovirus in the Lung. *J Immunol* 164: 443-51.
- MIWA, K., ASANO, M., HORAI, R., IWAKURA, Y., NAGATA, S., SUDA, T., 1998. Caspase 1-independent IL-1 β Release and Inflammation Induced by the Apoptosis Inducer Fas Ligand. *Nat Med* 4: 1287-92.
- MOORE, K. W., de WAAL-MALEFYT, R., VIEIRA, P., and MOSSMAN, T. R., 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-90.
- MOORE, K. W., de WAAL-MALEFYT, R., COFFMAN, R. L., and O'GARRA, A., 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- MORRAL, N., O'NEAL W. K., RICE, K., LELAND, M., PIEDRA, P. A., AGUILAR-CORDOVA, E., DEE CAREY, K., BEAUDET, A. L., and LANGSTON, C., 2002. Lethal Toxicity, Severe Endothelial Injury, and a Threshold Effect with High Doses of an Adenoviral Vector in Baboons. *Hum Gene Ther* 13: 143-54.
- MORRISON, D. F., FOSS, D. L., and MURTAUGH, M. P., 2000. Interleukin-10 Gene Therapy-Mediated Amelioration of Bacterial Pneumonia. *Infection & Immunity* 30(8): 4752-8.
- MORRISON, D. F. & MURTAUGH, M. P., 2001. Adenovirus-Mediated Expression of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Swine Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Vet Immunol & Immunopat* 78: 71-81.

- MURUVE, D. A., BARNES, M. J., STILLMAN, I. E., and LIBERMANN, T. A., 1999. Adenoviral Gene Therapy Leads to Rapid Induction of Multiple Chemokines and Acute Neutrophil-Dependent Hepatic Injury *in Vivo*. *Hum Gene Ther* 10: 965-76.
- NABEL, E.G., YANG, Z. Y., PLUTZ, G., FOROUGH, R., ZHAN, X., HAUDENSCHILD, C. C., MACIAG, T., and NABEL, G. J., 1993. Recombinant Fibroblast Growth Factor-1 Promotes Intimal Hyperplasia and Angiogenesis in Arteries *In Vivo*. *Nature* 29;362(6423):844-6.
- NABEL, E. G., YANG, Z., LIPTAY, S., SAN, H., GORDON, D., HAUDENSCHILD, C. C., and NABEL, G. J., 1993. Recombinant Platelet-Derived Growth Factor B Gene Expression in Porcine Arteries Induce Intimal Hyperplasia *In Vivo*. *J Clin Invest*. 91(4):1822-9.
- NEURINGER, I. P., WALSH, S. P., MANNON, R. B., GABRIEL, S., and ARIS, R. M., 2000. Enhanced T Cell Cytokine Gene Expression in Mouse Airway Obliterative Bronchiolitis. *Transplantation* 69(3): 399-405.
- NOVICK, R. J., MENKIS, A. H., and MCKENZIE, F. N., 1992. New Trends in Lung Preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 11: 377-92.
- OKADA, Y., SAITO, S., FUJISAWA, K., YAGI, T., and TANAKA, N., 2000. Does Adenovirus-Mediated Viral IL-10 Gene Transfer Prolong Survival of Xenogeneic Spheroidal Aggregate-Cultured Hepatocytes? *Transplant Proc* 32(5): 1021-3.
- OTAKE, K., ENNIST, D. L., HARROD, K., and TRAPNELL, B.C., 1998. Nonspecific Inflammation Inhibits Adenovirus-Mediated Pulmonary Gene Transfer and Expression Independent of Specific Acquired Immune Responses. *Hum Gene Ther* 9(15): 2207-22.
- PARTOVIAN, C., ADNOT, S., RAFFESTI, B., LUOZIER, V., LEVAME, M., MAVIER, I. M., LEMARCHAND, P., and EDDAHIBI, S., 2000. Adenovirus-

Mediated Lung Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression Protects Against Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(6): 762-71.

PATTERSON, G. A. & COOPER, J. D. - Lung Transplantation. In: Pearson, F. G. ... et al - Thoracic Surgery. Churchill Livingstone Inc., 1995. p. 931-59.

PHAM, S. M., YOSHIDA, Y., AEBA, R., HATTLER, B. G., IWAKI, Y., ZEEVI, A., HARDESTY, R. L., and GRIFFITH, B. P., 1992. Interleukin-6, a Marker of Preservation Injury in Clinical Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 11(6): 1017-24.

PIERRE, A. F., XAVIER, A. M., LIU, M., CASSIVI, S. D., LINDSAY, T. F., MARSH, H. S., SLUTSKY, A. S., and KESHAVJEE, S., 1998. Effect of Complement Inhibition with Soluble Complement Receptor 1 (sCR1) on Pig Allotransplant Lung Function. *Transplantation* 66(6): 723-32.

PIERRE, A. F., De CAMPOS, K. N., LIU, M., EDWARDS, V., CUTZ, E., SLUTSKY, A. S., and KESHAVJEE, S., 1998. Rapid Reperfusion Causes Stress Failure in Ischemic Rat Lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(6): 932-42.

PIERRE, A. F., SEKINE, Y., HUTCHEON, M. A., WADDELL, T. W., KESHAVJEE, S., 2002. Marginal Donor Lungs: A Reassessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123(3): 421-28.

POSTON, R. S., ENNEN, M., POLLARD, J., HOYT, E. G., BILLINGHAM, M. E., ROBBINS, R. C., 1998. *Ex Vivo* Gene Therapy Prevents Chronic Graft Vascular Disease in Cardiac Allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(3): 386-96.

QAYUMI, A. K., NIKBAKKHT-SANGARI, M., GODIN, D. V., ENGLISH, J. C., HORLEY, K. J., KEOWN, P. A., LIM, S. P., ANSLEY, D. M., KOEHLE, M. S., and TYERS, G. F. O., 1998. The Relationship of Ischemia-Reperfusion Injury of Transplanted Lung and the Up-Regulation of Major

Histocompatibility Complex II on Host Peripheral Lymphocytes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115(5): 978-89.

QIN, L., DING, Y., PAHUD, D. R., ROBSON, N. D., SHAKED, A., and BROMBERG, J. S., 1997. Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Viral Interleukin-10 Inhibits the Immune Response to Both Alloantigen and Adenoviral Antigen. *Hum Gene Ther* 8(11): 1365-74.

QIN, L., DING, Y., and BROMBERG, J., 1999. Use of Gene Therapy for Tolerogenic Signals. *Transplant Proc* 31(1-2) 882-3.

RACZKA, E., KUKOWSKA-LATALLO, J. F., RYMASZEWSKI, M., CHEN, C., and BAKER JR, J. R., 1998. The Effect of Synthetic Surfactant Exosurf on Gene Transfer in Mouse Lung *in Vivo*. *Gene Ther* 5: 1333-9.

RADWANSKI, E., CHAKRABORTY, A., VAN WART, S., HUHNS, R. D., CUTLER, D. L., AFFRIME, M. B., JUSKO, W. J., 1998. Pharmacokinetics and Leukocyte Responses of Recombinant Human Interleukin-10. *Pharm Res*. Dec;15(12):1895-901.

RALPH, P., NAKOINZ, I., SAMPSON-JOHANNES, A., FONG, S., LOWE, D., MIN, H-Y., and LIN, L., 1992. IL-10, T Lymphocyte Inhibitor of Human Blood Cell Production of IL-1 and Tumor Necrosis Factor. *J Immunol* 148(3): 808-14.

RAMANNA, L., TASHKIN, D. P., TAPLIN, G. V., ELAM, D., DETELS, R., COULSON, A., and ROKAW, S. N., 1975. Radioaerosol Lung Imaging in Chronic Obstrutive Pulmonary Disease. *Chest* 68(5): 634-40.

RIZZO, M., SIVASAI, K. S. R., SMITH, M. A., TRULOCK, E. P., LYNCH, J. P., PATTERSON, G. A., and MOHANAKUMAR, T., 2000. Increased Expression of Inflammatory Cytokines and Adhesion Molecules by Alveolar Macrophages of Human Lung Allograft Recipients with Acute Rejection: Decline with Resolution of Rejection. *J Heart Lung Transplant* 19(9): 858-65.

- ROGY, M. A., AUFFENBERG, T., ESPAT, N. J., PHILIP, R., REMICK, D., WOLLENBERG, G. K., COPELAND, E. M., and MOLDWER, L. L., 1995. Human Tumor Necrosis Factor Receptor (p55) and Interleukin 10 Gene Transfer in the Mouse Reduces Mortality to Lethal Endotoxemia and Also Attenuates Local Inflammatory Responses. *J Exp Med* 181: 2289-93.
- ROGY, M. A., BEINHAUER, B. G., REINISCH, W., HUANG, L., and POKIESER, P., 2000. Transfer of Interleukin-4 and Interleukin-10 in Patients with Severe Inflammatory Bowel Disease of the Rectum. *Hum Gene Ther* 11: 1731-41.
- ROSS, D. J., MOUDGIL, A., BAGGA, A., TOYODA, M., MARCHEVSKY, A. M., KASS, R. M., and JORDAN, S. C., 1999. Lung Allograft Dysfunction Correlates with γ -Interferon Gene Expression in Bronchoalveolar Lavage. *J Heart Lung Transplant* 18(7): 627-36.
- SAKAMAKI, F., HOFFMANN, H., MÜLLER, C., DIENEMANN, H., MESSMER, K., and SCHILDBERG, F. W., 1997. Reduced Lipid Peroxidation and Ischemia-Reperfusion Injury after Lung Transplantation Using Low-Potassium Dextran Solution for Lung Preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1073-81.
- SAKAMOTO, T., ARAKAWA, H., MITA, S., ISHIKO, T., IKEI, S., EGAMI, H., HISANO, S., and OGAWA, M., 1994. Elevation of Circulating Interleukin-6 After Surgery Factors Influencing the Serum Level. *Cytokine* 6 (2): 181-6.
- SAKUMA, T., TAKAHASHI, K., OHYA, N., KAJIKAWA, O., MARTIN, T.R., and ALBERTINE, K. H., 1999. Ischemia-reperfusion Lung Injury in Rabbits: Mechanisms of Injury and Protection. *Am J Physiol* 276: L137-L145.
- SCHIMD, R. A., NARITA, M., BOASQUEVISQUE, C. H., ANDO, K., BOTNEY, M. D., COOPER, J. D., SCHWARTZ, A. L., and PATTERSON, G. A., 1997. Adenovirus Mediated Gene Transfer into Rat Lung Grafts at the Time of Harvest. *Eur J Cardio-thor Surg* 11: 1023-8.

- SCHOLMA, J., SLEBOS, D., BOEZEL, H. M., van den BERG, J. W. K., van den BIJ, W., de BOER, W.J., KOËTER, G. H., TIMENS, W., Kauffman, H. F., and POSTMA, D. S., 2000. Eosiphilic Granulocytes and Interleukinn-6 Level in Bronchoalveolar Lavage Fluid Are Associated with the Development of Obliterative Bronchiolitis after Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2221-5.
- SERRICK, C., ADOUMIE, R., GIAID, A., and SHENNIB, H., 1994. The Early Release of Interleukin-2, Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ After Ischemia Reperfusion Injury in the Lung Allograft. *Transplantation* 58(11): 1158-62.
- SHAKED, A., CSETE, M. E., DRAZAN, K. E., BULLINGTON, D., WU, L., BUSUTTIL, R. W., and BERK, A.J., 1994. Adenovirus-Mediated Gene Transfer in the Transplant Setting. II. Successful Expression of Transferred cDNA in Syngeneic Liver Grafts. *Transplantation* 57(10): 1508-11.
- SHEAN, M. K., BASKIN, G., SULLIVAN, D., SCHURR, J., CAVENDER, D. E., SHELLITO, J. E., SCHWARZENBERGER, P.O., and KOLLS, J. K., 2000. Immunomodulation and Adenoviral Gene Transfer to the Lungs of Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther* 11: 1047-55.
- SOLOMON, M., 2000. Complex Ethical Issues in Gene Therapy. *Pediatr Pulmonol* suppl 20: 168.
- STEELE, F.R., 2000. A Matter of Trust. *Mol Ther* 1(4): 301.
- STEEN, S., KIMBLAD, P. O., SJOBERG, T., LINDBERG, L., INGEMANSSON, R., and MASSA, G., 1994. Safe Lung Preservation For Twenty-Four Hours with Perfadex®. *Ann Thorac Surg* 57(2): 450-7.
- STEEN, S., SJOBERG, T., INGEMANSSON, R., and LINDBERG, L., 1994. Efficacy of Topical Cooling in Lung Preservation: Is a Reappraisal Due? *Ann Thorac Surg* 58: 1657-63.

- SUNDARESAN, S., SEMENKOVICH, J., OCHOA, L., RICHARDSON, G., TRULOCK, E. P., COOPER, J. D., and PATTERSON, G.A., 1995. Successful outcome of lung transplantation is not compromised by the use of marginal donor lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109: 1075-80.
- SUNG, R. S., QIN, L., and BROMBERG J. S., 2001. TNF- α and IFN- γ Induced by Innate Anti-Adenoviral Immune Responses Inhibit Adenovirus-Mediated Transgene Expression. *Mol Ther* 3(5); 757-67.
- TAGA, T. & KISHIMOTO, T., 1997. GP-130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819.
- TAGAWA, T., SUDA, T., DADDI, N., KOZOWER, B. D., KANAAN, S. A., MOHANAKUMAR, T., and PATTERSON, G. A., 2002. Low-Dose Endobronchial Gene Transfer to Ameriolate Lung Graft Ischemia-Reperfusion Injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123(4): 795-802.
- TASHIRO, H., SHINOZAKI, K., YAHATA, H., HAYAMIZU, K., OKIMOTO, T., TANJI, H., FUDABA, Y., YAMAMOTO, H., FAN, X., ITO, H., and ASAHARA, T., 2000. Prolongation of Liver Allograft Survival After Interleukin-10 Gene Transduction 24-48 Hours Before Donation. *Transplantation* 70(2): 336-9.
- The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000. Ventilation with Lower Tidal Volumes As Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and The Acute Respiratory Distress Syndrome. *NEJM* 342(18):1301-8.
- THOMAS, C.E., BIRKETT, D., ANOZIE, I., CASTRO, M. G., and LOWENSTEIN, P.R., 2001. Acute Direct Adenoviral Vector Cytotoxicity and Chronic, but Not Acute, Inflammatory Responses Correlate with Decreased Vector-Mediated Transgene Expression in the Brain. *Mol Ther* 3(1): 36-46.

- THOMAS, P. A. & BUCHMAN, R. J., 1971. Successful 20 Hour Preservation of Ischemic Canine Lung by Hypothermia Combined with Minimal Ventilation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 62: 176-82.
- THOMAS-VASLIN, V., BELLIER, B., COHEN, J. L., BOYER, O., RAYNAL-RASCHILAS, N., GLOTZ, D., and KLATZMANN, D., 2000. Prolonged Allograft Survival Through Conditional and Specific Ablation of Alloreactive T Cells Expressing a Suicide Gene. *Transplantation* 69(10): 2154-61.
- TIPPING, P. G., KITCHING, A. R., HUANG, X. R., MUTCH, D. A., and HOLDSWORTH, S. R., 1997. Immune Modulation with Interleukin-4 and Interleukin-10 Prevents Crescent Formation and Glomerular Injury in Experimental Glomerulonephritis. *Eur J Immunol* 27(2): 530-7.
- TIROKE, A. H., BEWIG, B., HAVERICH, A., 1999. Bronchoalveolar Lavage in Lung Transplantation. State of the Art. *Clin Transplant*. Apr;13(2):131-57.
- TORONTO LUNG TRANSPLANT GROUP, 1986. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 314:1140-45.
- TORONTO LUNG TRANSPLANT GROUP, 1988. Experience with Single-lung Transplantation for Pulmonary Fibrosis. *JAMA* 259: 2258-62.
- TREPICCHIO, W. L., OZAWA, M., WALTERS, I. B., KIKUCHI, T., GILLEAUDEAU, P., BLISS, J. L., SCHWERTSCHLAG, U., DORNER, A. J., and KRUEGER, J. G., 1999. Interleukin-11 Therapy Selectively Downregulates Type I Cytokine Proinflammatory Pathway in Psoriasis Lesions. *J Clin Invest* 104(11): 1527-37.
- TRIPATHY, S. K., BLACK, H. B., GOLDWASSER, E., and LEIDEN, J. M., 1996. Immune Responses to Transgene-Encoded Proteins Limit the Stability of Gene Expression after Injection of Replication-Defective Adenovirus Vectors. *Nat Med* 2(5):545-50.

- TRULOCK, E.P., 1997. Lung Transplantation: State of art. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 789-818.
- TSAN, M. F., WHITE, J. E., PASTORE, J. N., HAYES, V. D., SHEPARD, B. A., and LEE, C. Y., 1996. Pulmonary Response to Plasmid DNA and Immunohistochemical Localization of Transgene Expression. *Exp Lung Res* 22(6):651-66.
- TZENG, E., SHEARS, L. L., LOTZE, M. T., and BILLIAR, T. R., 1996. Gene Therapy: Vectors and Delivery Systems. *Cur Probl Surg* 33: 989-1004.
- USUDA, J., OKUNAKA, T., FURUKAWA, K., TSUCHIDA, T., KUROIWA, Y., OHE, Y., SAIJO, N., HISHIO, K., KONAKA, C., and KATO, H., 2001. Increased Cytotoxic Effects of Photodynamic Therapy in IL-6 Gene Transfected Cells Via Enhanced Apoptosis. *Int J Cancer* 93: 475-80.
- VAN GINKEL, F. W., LIU, C., SIMECKA, J. W., DONG, J., GREENWAY, T., FRIZZELL, R. A., KIYONO, H., MCGHEE, J. R., and PASCUAL, D. W., 1995. Intratracheal Gene Delivery with Adenoviral Vectors Induces Elevated Systemic IgG and Mucosal IgA Antibodies to Adenovirus and β -Galactosidase. *Hum Gene Ther* 6: 895-903.
- VAN RAEMDONCK, D. E., JANNIS, N. C., REGA, F. R., DE LEYN, P. R., FLAMENG, W. J., and LERUT, T. E., 1997. Extended Preservation of Ischemic Pulmonary Graft by Postmortem Alveolar Expansion. *Ann Thorac Surg*. Sep;64(3):801-8.
- VAN SNICK, J., 1990. Interleukin-6: An Overview. *Annu Rev Immunol* 8:253-78.
- VEITH, F. J., SINHA, S. .B., GRAVES, J. S., BOLEY, S. J., and DOUGHERTY, J. C., 1971. Ischemic Tolerance of the Lung. The Effect of Ventilation and Inflation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 61: 804-10.

- VEITH, F. J., CRANE, R., TORRES, M., COLON, I., HAGSTROM, J. W., PINSKER, K *et al.*, 1976. Effective Preservation and Transportation of Lung Transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 72: 97-105.
- WADDELL, T. K., GORCZYNSKI, R. M., De CAMPOS, K. N., PATTERSON, G. A., and SLUTSKY, A. S., 1996. Major Histocompatibility Complex Expression and Lung Ischemia-Reperfusion in Rats. *Ann Thorac Surg* 62(3): 866-72.
- WAN, S., LeCLERC, J. L., and VINCENT, J. L., 1997. Cytokines Responses to Cardiopulmonary Bypass: Lessons Learned From Cardiac Transplantation. *Ann Thorac Surg* 63: 269-76.
- WANNER, G. A., ERTEL, W., MULLER, P., HOFER, Y., LEIDERER, R., and MENGER, M. D. *et al.*, 1996. Liver Ischemia and Reperfusion Induces a Systemic Inflammatory Response Through Kupffer Cell Activation. *Shock* 5: 34-40.
- WARD, P. A., 1996. Role of Complement, Chemokines, and Regulatory Cytokines in Acute Lung Injury. *Ann N Y Acad Sci* 796: 104-12.
- WEIS, C. M., FOX, W. W., PHILIPS, C. M., WOLFSON, M. R., and SHAFFER, T. H., 2000. Perfluorochemical Elimination From the Lungs: Effect of Initial Dose. *Pediatr Pulmonol* 30: 324-9.
- WEISS, D. J., LIGGIT, D., and CLARK, J.G., 1997. *In Situ* Histochemical Detection of β -Galactosidase Activity in Lung: Assessment of X-Gal Reagent in Distinguishing *lac-z* Gene Expression and Endogenous β -Galactosidase Activity. *Hum Gene Ther* 8: 1545-54.
- WEISS, D. J., STRANDJORD, T. P., LIGGIT, D., and CLARK, J.G., 1999. Perflubron enhances adenovirus-mediated gene expression in lungs of transgenic mice with chronic alveolar filling. *Hum Gene Ther* 10:2287-93.

- WEISS, D. J., BASKIN, G. B., SHEAN, M. K., BLANCHARD, J. L., and KOLLS, J. K., 2000. Use of perfluorochemical liquid to enhance adenoviral-mediated gene expression in lungs of spontaneously breathing non-human primates: feasibility and initial studies. *Pediatr Pulm* (suppl 20), 235-36.
- WHITEHEAD, B. F., STOEHR, C., WU, C. J., PATTERSON, G., BURCHARD, E. G., THEODORE, J., CLAYBERG, C., STARNES, V. A., 1993. Cytokine Gene Expression in Human Lung Transplant Recipients. *Transplantation* 56(4): 956-61.
- WHO-IUIS, 1992. Nomenclature Subcommittee on Interleukin Designation. Nomenclature for Secreted Regulatory Proteins of the Immune System (Interleukins). *Immunol Today* 13:118.
- WOLFF, B. R., GLICK, B. R., and PASTERNAK, J. J., 1990. DNA Sequence Analysis of Endoglucanase Genes from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* and *Pseudomonas sp.* . *J Ind Microbiol* 6(4):285-90.
- WONG, W., STRANFORD, S. A., MORRIS, P. J., and WOOD, K. J., 1997. Retroviral Gene Transfer of a Donor Class I MHC Gene to Recipient Bone Marrow Cells Induces Tolerance to Alloantigens *in Vivo*. *Transplant Proc* 29(1-2): 1130.
- WORGALL, S., LEOPOLD, P. L., WOLFF, G., FERRIS, B., Van ROIJEN, N., and CRYSTAL, R. G., 1997. Role of Alveolar Macrophages in Rapid Elimination of Adenovirus Vectors Administered to the Epithelial Surface of the Respiratory Tract. *Hum Gene Ther* 8: 1675-84.
- WORGALL, S., WOLFF, G., FALK-PEDERSEN, E., and CRYSTAL, R. G., 1997. Innate Immune Mechanisms Dominate Elimination of Adenoviral Vectors Following *in Vivo* Administration. *Hum Gene Ther* 8: 37-44.

- XAVIER, A. M., ISOWA, N., CAI, L., DZIAK, E., OPAS, M., McRITCHIE, D. I., SLUTSKY, A. S., KESHAVJEE, S., and LIU, M., 1999. Tumor Necrosis Factor – alpha Mediates Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Inflammatory Protein-2 Release from Alveolar Epithelial Cells: Auto-Regulation in Host Defense. *Am J Resp Cell Mol Biol* 21: 51—20.
- XU, Z. Z. KROUGLIAK, V., PREVEC, L., GRAHAM, F. L., and BOTH, G. W., u ZZ, Krougliak V, Prevec L, Graham FL, Both GW., 1995. Investigation of Promoter Function in Human and Animal Cells Infected with Human Recombinant Adenovirus Expressing Rotavirus Antigen VP7sc. *J Gen Virol* 76 (Pt 8):1971-80.
- YANG, Y., XIANG, Z., ERLT, H. C., and WILSON, J. .M., 1995. Upregulation of Class I Major Histocompatibility Complex Antigens by Interferon γ Is Necessary for T-Cell-Mediated Elimination of Recombinant Adenovirus-Infected Hepatocytes *in Vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 92: 7257-61.
- YANG, Y., LI, Q., ERLT,H. C., and WILSON, J. .M., 1995. Cellular and Humoral Immune Responses to Viral Antigens Create Barriers to Lung-Directed Gene Therapy With Recombinant Adenoviruses. *J Virol* 69(4): 2004-15.
- YANG, Y., SU, Q., and WILSON, J. M., 1996. Role of Viral Antigens in Destructive Cellular Immune Responses to Adenovirus Vector-Transduced Cells in Mouse Lungs. *J Virol* 70(10): 7209-12.
- YANO, M., HIRATSUKA, M., NAGAHIRO, I., MORA, B. N., SCHEULE, R. K., and PATTERSON, G. A., 1999. *Ex Vivo* Transfection of Pulmonary Artery Segments in Lung Isografts. *Ann Thorac Surg* 68(5): 1805-9.
- YANO, M., HIRATSUKA, M., MORA, B. N., SCHEULE, R. K., and PATTERSON, G. A., 1999. Transfection of Pulmonary Artery Segments in Lung Isografts During Storage. *Ann Thorac Surg* 68(5): 1810-4.

- YEW, N. S., WYSOKENSKI, D. M., WANG, K. X., ZIEGLER, R. J., MARSHALL, J., McNELLY, D., CHERRY, M., OSBURN, W., and CHENG, S. H., 1997. Optimization of Plasmid Vectors for High-Level Expression in Lung Epithelial Cells. *Hum Gene Ther* 8: 575-84.
- YOSHIDA, Y., IWAKI, Y., PHAM, S., DAUBER, J. H., YOUSEM, S. A., ZEEVI, A., MORITA, S., and GRIFFITH, B. P., 1993. Benefits of Posttransplantation Monitoring of Interleukin-6 in Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg* 55(1): 89-93.
- YOSHIDOME, H., KATO, A., EDWARDS, M. J., and LENTSCH, A. B., 1999. Interleukin-10 Suppresses Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice: Implications of a Central Role for Nuclear Factor κ B. *Hepatology* 30: 203-8.
- ZEIGLER, S. T., KERBY, D. T., CURIEL, J. N., WEHBY, A. G., DIETHELM, A. G., and THOMPSON, J. A., 1996. Molecular Conjugate-Mediated Gene Transfer in Renal Transplantation. *Transplant Proc* 28(4): 2046-48.
- ZHANG, H-G., ZHOU, T., YANG, P., EDWARDS III, C. K., CURIEL, D. T., and MOUNTZ, J. D., 1998. Inhibition of Tumor Necrosis Factor α Decreases Inflammation and Prolongs Adenovirus Gene Expression in Lung and Liver. *Hum Gene Ther* 9: 1875-84.
- ZHANG, H. Y. & PHAN, S. H., 1999. Inhibition of Myofibroblast Apoptosis by Transforming Growth Factor beta (1). *Am J Cell Mol Biol* 21: 658-65.
- ZHENG, B. J., GRAHAM, F. L., and PREVEC, L., 1999. Transcription Units of E1a, E1b and pIX regions of Bovine Adenovirus Type 3. *J Gen Virol* 80: 1735-42.
- ZOU, X-M., YAGIHASHI, A., HIRATA, K., TSURUMA, T., MATSUNO, T., TARUMI, K., ASANUMA, K., and WATANABE, N., 1998. Downregulation

of Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant and Prolongation of Rat Liver Allograft Survival by Interleukin-10. *Surg Today* 28(2):184-91.

ZSENGELLÉR, Z. K., WERT, S. E., BACHURSKI, C. J., KIRWIN, K. L., TRAPNELL, B. C., and WHITSETT, J. A., 1997. Recombinant Adenoviral Vector Disrupt Surfactant Homeostasis in Mouse Lung. *Hum Gen Ther* 8: 1331-44.

ZWACKA, R. M., ZHANG, Y., HALLDORSON, J., SCHLOSSBERG, H., DUDUS, L., and ENGELHARDT, J. F., 1997. CD4⁺ T-Lymphocytes Mediate Ischemia/Reperfusion-Induced Inflammatory Responses in Mouse Liver. *J Clin Invest* 100(2): 279-89.