

# El uso de terapia genética pulmonar en el tratamiento de modelos experimentales de neumonía y septicemia

Dr. David Machado-Aranda<sup>1,2</sup>

## INTRODUCCIÓN

La definición moderna de terapia genética es la introducción de material de ácidos nucleicos (ADN-ácido desoxirribonucleico o ARN-ácido ribonucleico) o sus derivados que codifican información que es leída por la máquina de transcripción nuclear produciendo proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades (Figura 1) (1). Tradicionalmente, se consideraba solo como una alternativa para la corrección de enfermedades congénitas de mutación única por genes defectuosos. Sin embargo, desde la simultánea publicación en paralelo de la secuencia completa del genoma humano por parte del Consorcio Internacional para el Genoma Humano (2) y por Craig Venter y col. (3) en el año 2001, nos damos cuenta de que existe un componente genético evolutivo importante que habla de la adaptabilidad y resistencia del huésped a luchar contra las enfermedades.

Por ejemplo, cerca de 80 % de nuestros genes cambian su expresión luego de haber sufrido un accidente o quemadura grave (4). La forma en como varía esta respuesta genética pudiera ser

un factor determinante en el curso de la historia natural de muchas de enfermedades. De esta observación parte entonces, la lógica intención de modificar la expresión genética en forma favorable.

A pesar de su gran potencial, la terapia genética, no ha podido pasar más allá de la fase experimental. Esto se debe a problemas relacionados con la producción, eficacia y efectos secundarios de los actuales vectores de transmisión genética (1,5). En este trabajo resumimos algunos de los adelantos que mi laboratorio ha llevado a cabo para avanzar el campo la de terapia genética, en especial en su aplicación para enfermedades del pulmón.

## Métodos virales

La terapia genética emplea vectores virales como los métodos más comunes de transmisión de material genético (6,8). Los virus no son más que material genético encapsulado por proteínas que permiten el reconocimiento de receptores de superficie y su entrada a la célula (Figura 2). Dichas proteínas cumplen dos funciones importantes: en primer lugar, la de secuestrar la maquinaria de lectura interna celular (transcripción) que permiten la reproducción del material genético viral. Y en segundo lugar, la de favorecer la producción de proteínas virales por encima de las propias del huésped. En el laboratorio, artificialmente podemos reemplazar grandes fragmentos del genoma viral por el

Presentado como Perla Clínica en la Sesión de la Academia Venezolana de Medicina.

<sup>1</sup> Laboratorio del Estudio de la Biología y Terapia Molecular para el Manejo del Trauma Pulmonar.

<sup>2</sup> División de Cirugía de Trauma, Quemados y Urgencias – Terapia Intensiva Quirúrgica, Universidad de Michigan, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos de América.

## Principios de la Terapia Genética

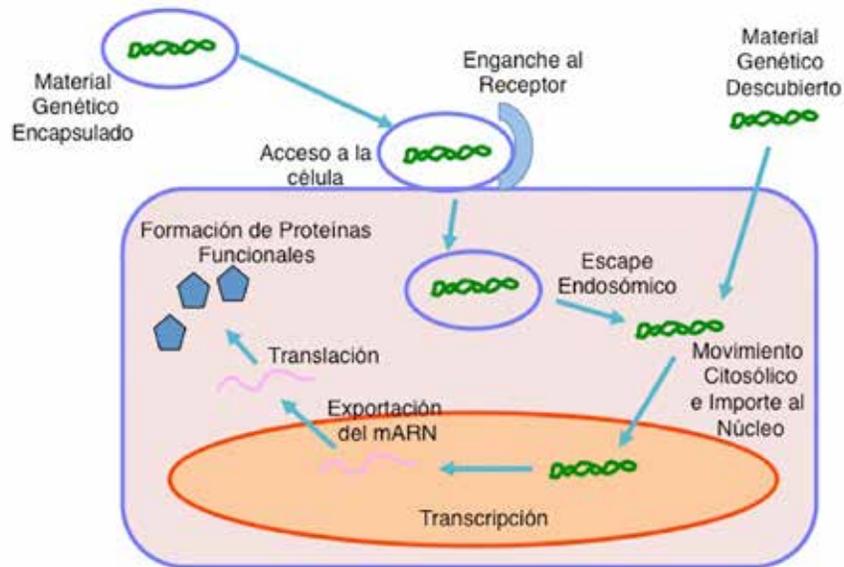


Figura 1. Principios de la Terapia Genética. El material genético es aportado desde el exterior de la célula a través de una cubierta proteica o química que permite el acceso hacia el interior. Luego dicho material llega al núcleo donde es leído formando ARN mensajero que luego es traducido a proteínas funcionales.

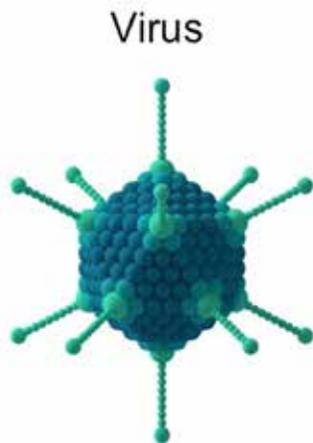


Figura 2. Esquema de una Adenovirus. Proteínas de la cápside (cubierta viral) enganchan a receptores de superficie celular que permite su entrada a la célula. Los Adenovirus modificados son uno de los vectores más potentes de Terapia Genética. Mutaciones artificiales creadas en el laboratorio impiden, en la mayoría de los casos, la replicación viral y en consecuencia reacciones inflamatorias secundarias.

humano. Esto nos permite la reproducción de genes terapéuticos y promueve a la vez, la desactivación de muchas funciones virales con el cual se evita la destrucción de la célula, bloqueando la continuación del ciclo de infección viral.

Sin embargo, la producción y almacenamiento de vectores virales tienen múltiples problemas, lo que trae alto costo y poco acceso. Entre algunos ejemplos encontramos:

Contaminantes de las líneas de producción que pueden introducir nuevos vectores con mutaciones que produzca efectos no deseados o peor aún nuevos tipos de enfermedades.

Los virus puede estimular una respuesta humoral por parte del huésped produciendo una respuesta inflamatoria sistémica contra la viremia y anticuerpos que impidan su re-aplicación y en consiguiente, la pérdida de su eficacia terapéutica.

Algunos vectores como los retrovirus y lentivirus pueden insertar el material genético terapéutico en lugares críticos que activan

oncogenes cancerígenos que estaban durmientes, induciendo la aparición de tumores malignos.

Finalmente, algunos vectores virales pueden infectar a órganos no-blanco debido a la presencia hasta ese momento desconocida de receptores virales, lo cual produce efectos secundarios severos debido a la disfunción de dichos órganos.

Para ilustrar las consecuencias de estos problemas citamos el caso del joven de 18 años Jesse Gelsinger quien se encontraba bajo el cuidado del Dr. James Wilson en un tratamiento experimental para resolver la deficiencia de la enzima ornitina transcarbamilasa (OTC) utilizando un Adenovirus. Sin embargo, con el uso de dicho vector se produjo un síndrome de respuesta sistémica muy severa que indujo una falla multi-orgánica y seguidamente su muerte a los 4 días de tratamiento. Investigaciones por parte de la Administración Federal de Medicinas y Alimentos (FDA) identificaron fallas por parte de los investigadores que hubiesen podido evitar esta tragedia. A partir de ese momento, se produjo una moratoria en ensayos clínicos dentro de los Estados Unidos, creando un desinterés y desincentivo por el método haciendo retroceder el progreso que se había logrado hasta ese entonces (9).

### Resurgimiento de la terapia genética en el siglo XXI

El reciente descubrimiento del complejo CRISPR-Cas9 y de las proteínas TALEN, han hecho que por primera vez la edición fidedigna y poco costosa del genoma humano esté al alcance de todos, permitiendo un avance explosivo de conocimientos relacionados con la regulación genética de muchas enfermedades (Figura 3) (10,11). Esto representa un potencial terapéutico inmenso. Sin embargo, debido a que estas proteínas y sus secuencias guía no se encuentran en forma natural dentro de las células humanas, ellas deben ser aportadas desde el exterior de la mismas. Todo ello ha renovado un interés por las técnicas de terapia genética. Ahora bien, se urge cautela para evitar los mismos errores del pasado. Coincidimos con muchos autores que para poder trasladar estos conceptos del laboratorio experimental a su eventual aplicación clínica, se requieren de rigurosos estudios de farmacocinética, farmacodinamia y de seguridad para cada secuencia aportada tal cual como si

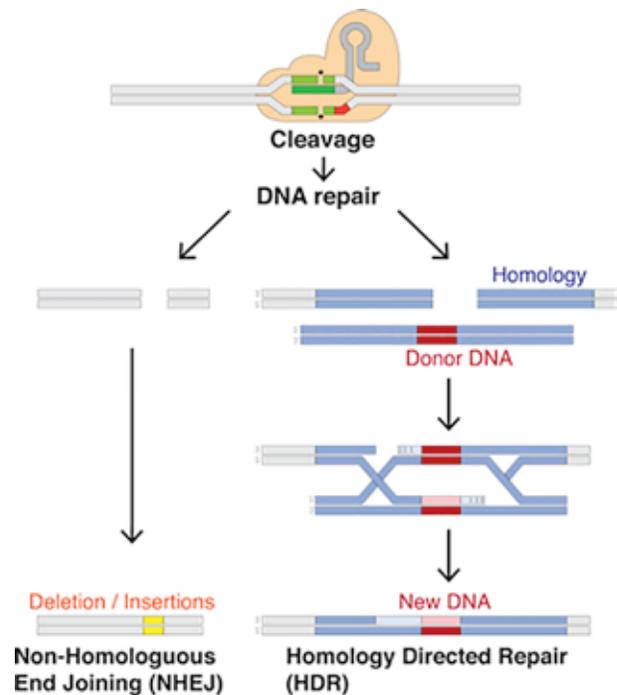


Figura 3. Sistema CRISPR-CAS9. Es un complejo sistema enzimático y de material genético guía que ha permitido un progreso acelerado en técnicas de edición fidedigna del genoma humano.

se tratara de una droga para tratar insuficiencia cardíaca o septicemia (12-14).

### Métodos no-virales

En vista de los problemas surgidos con vectores virales, existe un fuerte incentivo para usar técnicas de terapia genética no-virales. Estas se dividen en métodos químicos o en métodos físicos de transmisión de carga. Entre los métodos químicos encontramos polímeros anfipáticos como liposomas, polisomas y dendrímeros que poseen componentes hidrófobos e hidrófilos que envuelven a los ácidos nucleicos y permiten su fusión con la membrana celular (Figura 4) (15,16). Seguidamente, mediante mecanismos de endocitosis y de escape citosólico, el material genético llega al núcleo permitiendo que los códigos puedan ser leídos y traducidos

## Métodos Químicos No Virales

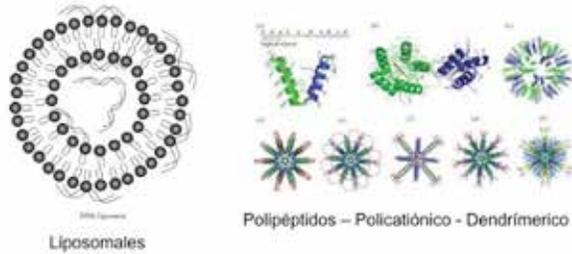


Figura 4. Métodos Químicos No Virales. Complejas sustancias poliméricas con capacidad de enlazar ADN o ARN y permitir su entrada a la célula han sido estudiadas con poco éxito para su aplicación clínica debido a su baja eficiencia en expresión.

creando proteínas funcionales. Sin embargo, este proceso es muy ineficiente, y rara vez se alcanzan niveles de expresión importantes que puedan causar impacto terapéutico alguno (17). Por otro lado, se ha reconocido que los métodos químicos no son del todo inocuos, ya que pueden provocar respuestas inflamatorias similares a las encontradas en la transmisión por partículas virales, lo cual podría ser un obstáculo para su aplicación clínica (18).

Entre los segundos métodos, encontramos aquellos que utilizan energía mecánica como la inyección hidrostática, el ultrasonido o la pistola genética o que utilizan energía de potencial eléctrico como la electroporación para promover la entrada directa de ácidos nucleicos a las células expuestas (19-21). Entre sus ventajas teóricas hallamos que el efecto terapéutico está solo circunscrito a los campos de influencia de cada uno de estos métodos. Además producen mínimo daño celular lo cual permite la posibilidad de su re-aplicación sin efectos secundarios. El poder escalar de modelos experimentales pequeños a su aplicación en humanos es la limitación más clara en estos momentos, sin embargo, avances en bioingeniería han permitido el progreso y ya existen formas de su actual uso clínico integrado a otros tratamientos comunes (22).

### La electroporación pulmonar

La posibilidad de obtener fácil acceso al

epitelio respiratorio y del parénquima alveolar combinado con la actual falta de tratamiento definitivo (aquella que puedan alterar el curso natural de una enfermedad) contra el asma, la fibrosis quística, el enfisema pulmonar y el cáncer del pulmón, es en teoría una necesidad oportuna para explorar técnicas alternativas como la terapia genética pulmonar (1). Esto no es una tarea fácil, ya que el pulmón es naturalmente resistente a invasión microbiana. El sistema respiratorio posee mecanismos como la producción de moco, macrófagos que patrullan el espacio aéreo y su epitelio produce proteínas de barrera del complejo ocludina que le cierran el paso a los virus y liposomas para acceder a sus receptores de membrana ubicadas en porción basolateral de la membranas celulares (Figura 5) (5).

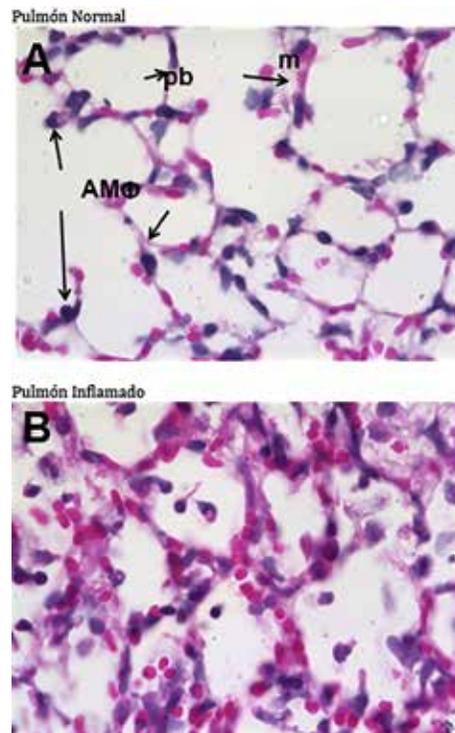


Figura 5. A. El pulmón constituye una barrera formidable para la Terapia Genética. En condiciones normales posee distintos mecanismos (moco, surfactante, proteínas de barrera tipo ocludina, macrófagos alveolares) que impiden la invasión microbiana, en especial virus que son las plataformas de transferencia genética más utilizadas. B. Dichos mecanismos se encuentran acrecentados durante condiciones inflamatorias y de enfermedad.

Para circunvalar los retos existentes con el uso de virus y otras técnicas de transferencia genética, nuestro laboratorio ha adoptado el uso de la electroporación. (Figura 6)(23,24). Utilizando un campo eléctrico, breve e intenso, se crean poros en la membrana celular que permiten el movimiento de macromoléculas cargadas como los ácidos nucleicos (ADN, ARN, oligonucleótidos). La transferencia es delimitada por la geometría creada por los electrodos, es segura ya que al nivel energético es de poco amperaje. Finalmente, es eficiente ya que alcanza altos niveles de expresión similares a los mejores virus con la ventaja de evitar la respuesta inflamatoria secundaria que siempre acompaña a la transferencia genética viral (Figura 7).

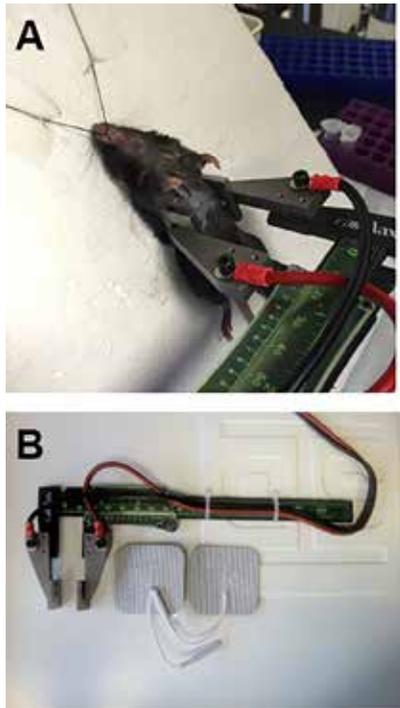


Figura 6. Electroporación Pulmonar. La electroporación consiste en aplicar un campo eléctrico que permite la creación de poros en la membrana celular por el cual el material genético se transfiere al interior de la célula. Puede ser utilizada *in vitro* a nivel celular, así como también *in vivo* en animales vivos. Posee múltiples ventajas entre ellas la sencillez y la falta de efectos secundarios. El nivel energético es solo de 0,25 Joules/Kg muy por debajo del utilizado por un desfibrilador cardíaco externo. A. Electroporación *in vivo* para inducir expresión en el pulmón B. Distintos electrodos que pueden ser utilizados para electroporación *in vivo*.

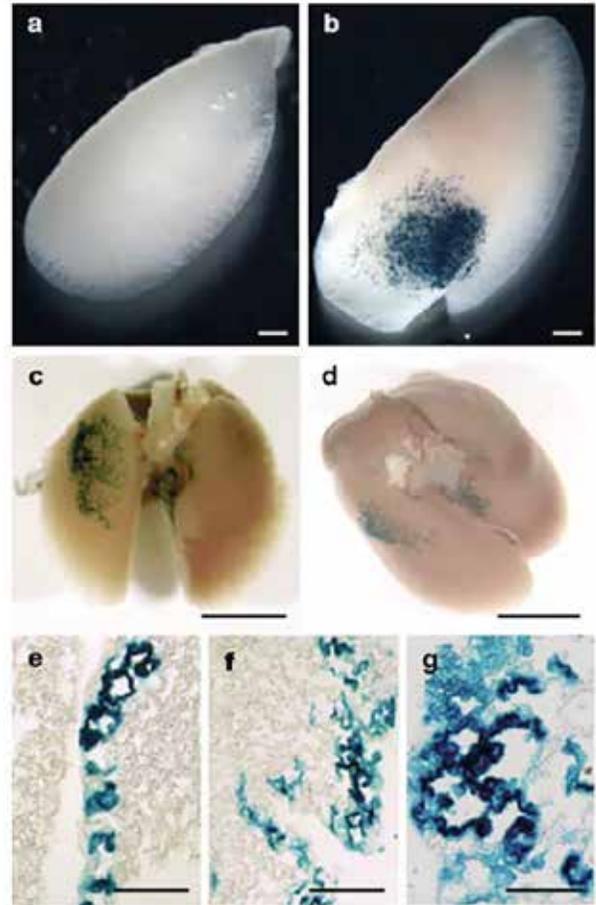


Figura 7. Electroporación Pulmonar es controlado por la geometría y propiedades eléctricas de los tejidos. La acción de la electroporación es guiada por la capacidad de conducción y resistencia de los tejidos y permiten la entrada del material genético cuando se alcanza un umbral (usualmente 200 V/cm). A. Pulmón control B. Pulmón que fue electroporado con un plásmido codificando el gene betagalactosidasa reaccionado con el agente bromuro de X-gal, coloreando las áreas positivas en azul. En este caso se utilizó un electrodo redondo de 7 mm. C-D. Pulmones electroporados con el mismo plásmido con un electrodo cuadrado. E-G. Secciones histológicas de pulmones mostrados en C-D mostrando que todas las células alveolares son capaces de ser transferidas genéticamente.

#### Uso de terapia genética pulmonar en traumatismo torácico y sus consecuencias pulmonares

Luego de una contusión pulmonar (CP) se producen varios cambios fisiológicos e inmunológicos que hacen al pulmón vulnerable

a infección, algunos explicados por alteraciones de expresión genética (Figura 8) (27-28). Entre estos cambios se encuentra la desaparición de macrófagos alveolares, que conjuntamente con la presencia de una hemorragia intra-alveolar, permiten a bacterias alojarse y reproducirse sin oposición causando neumonía (PNA) para luego invadir al sujeto produciendo infecciones aún más severas como septicemia. De allí que no sea sorpresa las observaciones clínicas realizadas por Bulger y col. (2000) (29), donde en pacientes mayores de 65 años con más de dos fracturas de costilla y PNA tengan un incremento significativo en su riesgo de morir más allá de la presencia de otros factores de riesgo como enfermedades cardiovasculares y crónicas como diabetes. El traumatismo de la caja torácica hoy en día es una de las razones principales de admisión para unidades de terapia intensiva en el mundo(30,31).

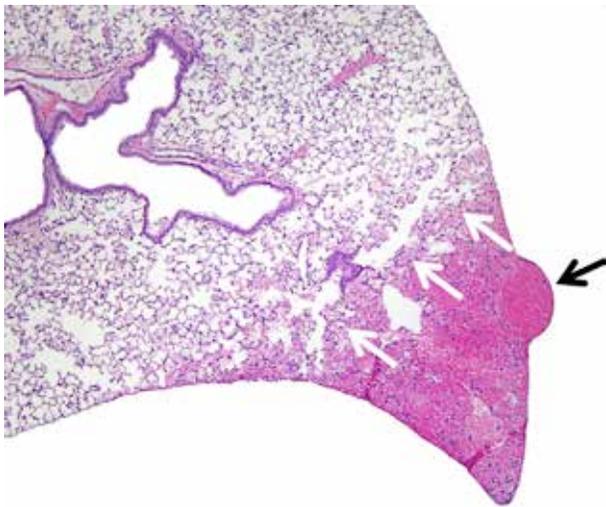


Figura 8. Contusión Pulmonar. Corte histológico de una área de contusión pulmonar luego de un traumatismo cerrado de caja torácica. Se muestra un área definida de hemorragia rodeada por una interface con cambios inflamatorios profundos. Esta área es susceptible a infecciones secundarias bacterianas. La combinación de estos insultos acarrea graves consecuencias como la falla pulmonar aguda, septicemia con una mortalidad superior al 40 %.

Nuestro laboratorio ha creado un modelo experimental de contusión torácica en roedores que reproduce muchas de las características presentes en la condición humana (Figura 9)(32). En una serie de publicaciones hemos estudiado los mecanismos moleculares desencadenados por una contusión pulmonar y hemos demostrado entre otras cosas como el incremento de la permeabilidad capilar, cambios en la composición química del surfactante alveolar y una desregulación de la respuesta inflamatoria, impiden la expansión e intercambio gaseoso adecuado del pulmón (25,27,28,31,33-36). Este insulto, al ser combinado con la aspiración de bacterias Gram negativas, produce la muerte de más de 80 % de los animales a los 5 días. Esto constituye un excelente modelo con el cual podemos probar nuestras hipótesis y examinar la factibilidad de la utilización terapia genética como herramienta terapéutica.

Una de las primeras proteínas que sondeamos fue la bomba sodio-potasio-ATPasa para el tratamiento del edema producido por la permeabilidad capilar producida en lesiones agudas del pulmón. En efecto la transmisión genética de las subunidades de la bomba mejoraron el movimiento de agua y sal hacia afuera del pulmón disminuyendo a su vez al severidad de la respuesta inflamatoria (Figura 10) (37,38). En la búsqueda de otros genes candidatos una reporte por Rautanen y col. en 2015 encontraron que el alelo C/T de la proteína FER (*Feline-sarcoma related to fes/fps*) era protectora con una reducción de la mortalidad de 44 % en pacientes con neumonía y septicemia (39). Seguidamente, procedimos a realizar la transferencia por electroporación de este gen en el modelo experimental combinado de contusión pulmonar con neumonía producida por *Klebsiella* sp., obteniendo resultados espectaculares de más de 80 % de supervivencia comparado con menos de 20 % en los controles. Encontramos que FER modula la respuesta inflamatoria, erradicando en forma efectiva la infección bacteriana y acelerando la recuperación pulmonar (Figura 11) (40,41).

### Consideraciones futuras

El uso indiscriminado de antibióticos ha

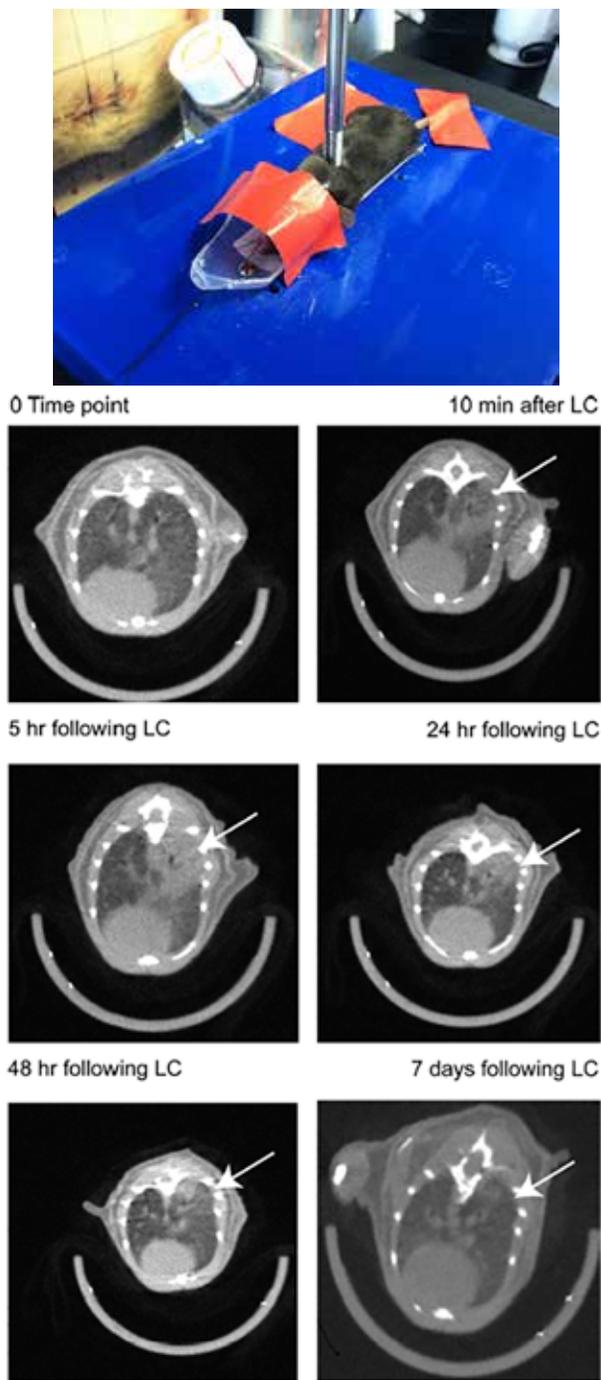


Figura 9. Modelo Experimental de Trauma Torácico y Contusión Pulmonar. A. Un pistón disparado a una velocidad de 5,62 m/s contra el costado derecho crea una lesión de contusión pulmonar similar a los encontrados en humanos. B. Micro-tomografías computadas de pulmón mostrando la evolución de las lesiones de contusión pulmonar. Dicha evolución es muy similar a la encontrada en humanos con la misma condición traumática.

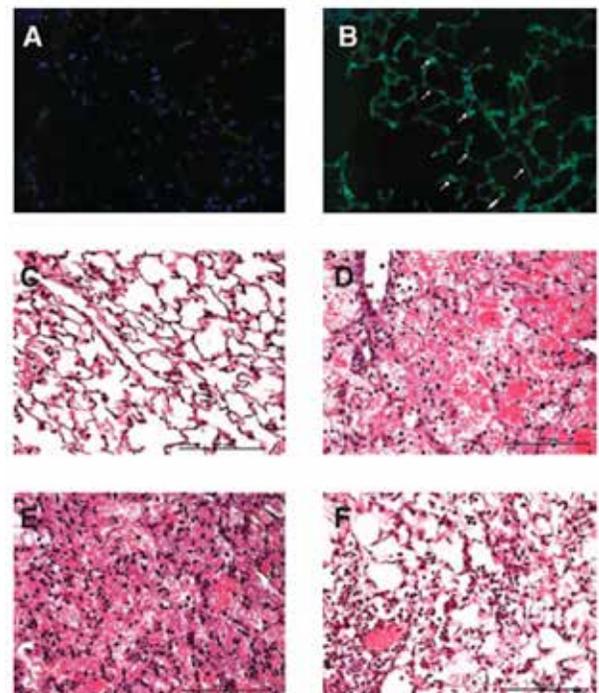


Figura 10. Electroporación de la bomba Sodio-Potasio-ATPasa en modelo experimental de contusión pulmonar. A pesar del daño producido por la contusión pulmonar, se muestra con éxito la transferencia genética al pulmón utilizando electroporación. A. Pulmón con transferencia de un vector vacío. B. Transferencia con la subunidad beta de la bomba marcada con proteína verde fluorescente. C. Histología de un pulmón normal D. Histología del área de contusión pulmonar a las 24 hr. E. Histología del área de contusión pulmonar a las 24 hr sujeta a electroporación de un vector vacío. F. Histología del área de contusión pulmonar a las 24 hr sujeta a la electroporación de la bomba Sodio-Potasio-ATPasa.

sido señalado como la causa de la aparición de organismos bacterianos de resistencia múltiple de letal virulencia, en especial en pacientes admitidos a la terapia intensiva. Compuestos alternativos a antibióticos como la colistina, pero a ellos también se les han reportado casos de resistencia por *Escherichiacoli* y *Klebsiella pneumonia* en distintos países. A este ritmo agotaremos todas las posibilidades efectivas de tratamiento (42-46).

A pesar de este panorama desalentador, encontramos que la terapia genética pulmonar además de ofrecer restaurar los procesos fisiológicos pulmonares mediante la

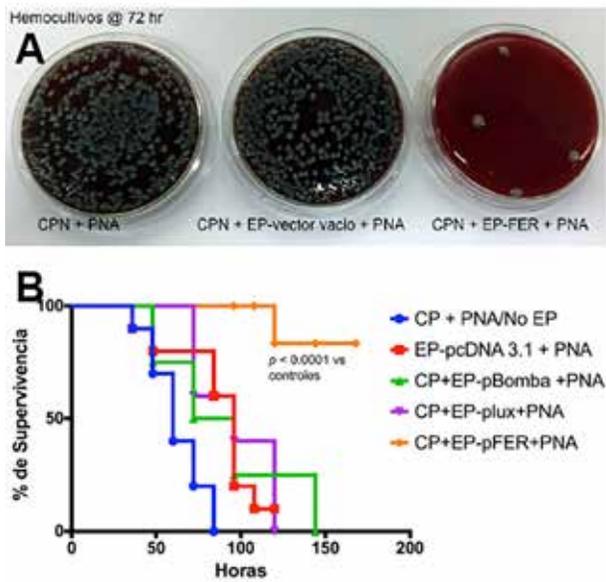


Figura 11. Electroporación del gen FER. A. Hemocultivos derivados de animales sujetos a contusión pulmonar y neumonía con *Klebsiella* mostrando el control de infección por parte del gen FER luego de su transferencia utilizando la electroporación. B. Curvas de supervivencia mostrando la efectividad del tratamiento de FER luego de la transmisión genética.

sobreexpresión de proteínas, puede modular y potenciar el sistema inmune propio del huésped para luchar contra las infecciones, algo que la evolución ha demostrado ser más efectiva que todos los antibióticos combinados.

Queda por resolver entonces las preguntas de ámbito biotecnológico como la creación de un instrumento broncoscópico que pueda trasladar este método a su aplicación clínica en unidades de terapia intensiva (Figura 12). Esto requiere de la colaboración de expertos de distintas ramas científicas (Medicina, Cirugía, Biología e Ingeniería Eléctrica-Industrial-Biomédica) con el fin de evitar los errores del pasado.

Igualmente debemos promover cautela y paciencia con el uso paulatino de estos métodos, y que además las ediciones intencionales del genoma humano, deben realizarse con los más estrictos criterios éticos, ya que al facilitarse la edición genética hemos hecho real, el peligro de poder producir eugenesia o “pureza genética”,

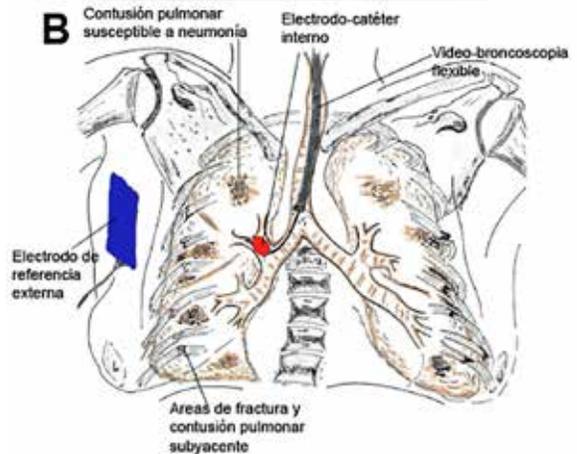


Figura 12. A. Vista de un paciente en la unidad de Terapia Intensiva y Quemados con infección con *Pseudomonas* sp. con resistencia a múltiples antibióticos de última generación. B. Esquema de posible aplicación terapéutica de terapia genética electroporativa en el pulmón.

un cuerpo teórico atroz producido por científicos nazis durante la Segunda Guerra Mundial. Jesse Gelsinger y demás pacientes que sufrieron durante el desarrollo apresurado de la terapia lo exigen y la humanidad lo requiere, ya que de no ser así dejaremos de ser... seres humanos.

### Agradecimientos

El autor desea agradecer a las personas que participaron en su formación médica y científica

tanto en Venezuela (Antonio Machado-Allison, Roberto Sánchez de León y Nicolás Bianco y demás profesores de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Universidad Central de Venezuela) como en el exterior (David A Dean, Jacob I Sznajder y Krishnan Raghavendran). Mucha de la data fue generada por la labor incasable de distintos investigadores que han laborado bajo la tutela del autor (Vladislav Dolgachev, MV Suresh, Bi Yu, Rebecca Goldberg, Lane McCandless, Yu Yin y Shreehari Panicker) así como el de compartir ideas con generosos colaboradores (Alejandro Comellas, Liuska Pesce). El autor se encuentra subvencionado por una Beca de Investigación K12 de Instituto Nacional de Higiene de los Estados Unidos K12-HL133304; así como también del apoyo del Instituto de Investigaciones Integradas en Terapia Intensiva de la Universidad de Michigan.

#### REFERENCIAS

- Lin X, Dean DA. Gene therapy for ALI/ARDS. *Crit Care Clin.* 2011;27:705-18.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409:860-921.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
- Tompkins RG. Genomics of injury: The Glue Grant experience. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015;78:671-86.
- Weiss DJ. Delivery of gene transfer vectors to lung: obstacles and the role of adjunct techniques for airway administration. *Mol Ther.* 2002;6:148-52.
- Factor P, Dumasius V, Saldias F, Sznajder JI. Adenoviral-mediated overexpression of the Na,K-ATPase beta1 subunit gene increases lung edema clearance and improves survival during acute hyperoxic lung injury in rats. *Chest.* 1999;116:24S-5S.
- Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* 2003;10:935-40.
- Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 2004;15:1157-66.
- Gay Stolberg S. The Biotech Death of Jesse Gelsinger. *The New York Times Magazine* 1999 November 28, 1999.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346:1258096.
- Barrangou R, May AP. Unraveling the potential of CRISPR-Cas9 for gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15:311-4.
- Sueblinvong V, Weiss DJ. Cell therapy approaches for lung diseases: Current status. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:268-73.
- Caimi PF, Reese J, Lee Z, Lazarus HM. Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 2010;17:505-13.
- Li L, He ZY, Wei XW, Gao GP, Wei YQ. Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors. *Hum Gene Ther.* 2015;26:452-62.
- Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014;15:541-55.
- Steyer B, Carlson-Stevermer J, Angenent-Mari N, Khalil A, Harkness T, Saha K. High content analysis platform for optimization of lipid mediated CRISPR-Cas9 delivery strategies in human cells. *Acta Biomater.* 2016;34:143-58.
- Griesenbach U, Sumner-Jones SG, Holder E, Munkonge FM, Wodehouse T, Smith SN, et al. Limitations of the murine nose in the development of nonviral airway gene transfer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43:46-54.
- Sakurai H, Kawabata K, Sakurai F, Nakagawa S, Mizuguchi H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int J Pharm.* 2008;354:9-15.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1:841-5.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4262-7.
- Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, et al. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther.* 2000;2:178-87.
- Heller R, Heller LC. Gene electrotransfer clinical trials. *Adv Genet.* 2015;89:235-62.
- Dean DA, Machado-Aranda D, Blair-Parks K, Yeldandi AV, Young JL. Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther.* 2003;10:1608-15.
- Machado-Aranda D, Adir Y, Young JL, Briva A, Budinger GR, Yeldandi AV, et al. Gene transfer of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase beta1 subunit using electroporation increases lung liquid clearance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:204-11.
- Raghavendran K, Davidson BA, Woytash JA, Helinski

- JD, Marschke CJ, Manderscheid PA, et al. The evolution of isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma in rats: Cellular and cytokine responses. *Shock*. 2005;24:132-8.
26. Raghavendran K, Notter RH, Davidson BA, Helinski JD, Kunkel SL, Knight PR. Lung contusion: inflammatory mechanisms and interaction with other injuries. *Shock* 2009;32:122-30.
  27. Machado-Aranda D, Wang Z, Yu B, Suresh MV, Notter RH, Raghavendran K. Increased phospholipase A2 and lyso-phosphatidylcholine levels are associated with surfactant dysfunction in lung contusion injury in mice. *Surgery*. 2013;153:25-35.
  28. Machado-Aranda D, M VS, Yu B, Dolgachev V, Hemmila MR, Raghavendran K. Alveolar macrophage depletion increases the severity of acute inflammation following nonlethal unilateral lung contusion in mice. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;76:982-90.
  29. Bulger EM, Arneson MA, Mock CN, Jurkovich GJ. Rib fractures in the elderly. *J Trauma* 2000;48:1040-6; discussion 6-7.
  30. Miller PR, Croce MA, Kilgo PD, Scott J, Fabian TC. Acute respiratory distress syndrome in blunt trauma: Identification of independent risk factors. *Am Surg*. 2002;68:845-50; discussion 50-1.
  31. Dolgachev VA, Yu B, Reinke JM, Raghavendran K, Hemmila MR. Host susceptibility to gram-negative pneumonia after lung contusion. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72:614-22; discussion 22-3.
  32. Machado-Aranda D, Raghavendran K. Electroporation-mediated delivery of genes in rodent models of lung contusion. *Methods Mol Biol*. 2014;1121:205-21.
  33. Raghavendran K, Davidson BA, Helinski JD, Marschke CJ, Manderscheid P, Woytash JA, et al. A rat model for isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma. *Anesth Analg*. 2005;101:1482-9.
  34. Raghavendran K, Davidson BA, Knight PR, Wang Z, Helinski J, Chess PR, et al. Surfactant dysfunction in lung contusion with and without superimposed gastric aspiration in a rat model. *Shock*. 2008;30:508-17.
  35. Suresh MV, Yu B, Machado-Aranda D, Bender MD, Ochoa-Frongia L, Helinski JD, et al. Role of Macrophage Chemoattractant Protein 1 in Acute Inflammation Following Lung Contusion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 46(6):797-806.
  36. Suresh MV, Thomas B, Machado-Aranda D, et al. Double-Stranded RNA Interacts With Toll-Like Receptor 3 in Driving the Acute Inflammatory Response Following Lung Contusion. *Crit Care Med*. 2016;44:e1054-e66.
  37. Mutlu GM, Machado-Aranda D, Norton JE, Bellmeyer A, Urich D, Zhou R, et al. Electroporation-mediated gene transfer of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase rescues endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:582-90.
  38. Machado-Aranda DA, Suresh MV, Yu B, Raghavendran K. Electroporation-mediated in vivo gene delivery of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump reduced lung injury in a mouse model of lung contusion. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72:32-9; discussion 9-40.
  39. Rautanen A, Mills TC, Gordon AC, Hutton P, Steffens M, Nuamah R, et al. Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: An observational cohort study. *Lancet Respir Med*. 2015;3:53-60.
  40. Dolgachev VA, Goldberg R, Suresh MV, Thomas B, Talarico N, Hemmila MR, et al. Electroporation-mediated delivery of the FER gene in the resolution of trauma-related fatal pneumonia. *Gene Ther*. 2016;23:785-96.
  41. Dolgachev V, Panicker S, Balijepalli S, Suresh MV, Raghavendran K, Machado-Aranda D. Overexpression of FER gene by Electroporation Enhances Survival In Trauma Complicated Fatal Pneumonia Via Fast Recruitment and Activation of Monocytes. *Shock* 2017;47:Abstract P173.
  42. McGrath EJ, Asmar BI. Nosocomial Infections and Multidrug-Resistant Bacterial Organisms in the Pediatric Intensive Care Unit. *Indian J Pediatr*. 2010.
  43. Patel G, Perez F, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii: Assessing their impact on organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010.
  44. Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. Multiresistant Gram-negative infections: A global perspective. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23:546-53.
  45. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1119-25.
  46. Gregory CJ, Llata E, Stine N, Gould C, Santiago LM, Vazquez GJ, et al. Outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:476-84.