

O USO DA TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

USE OF GENE THERAPY IN THE TREATMENT OF DISEASES

DÂNIA CAROLINE FÉCCHIO^{1*}, LUCIANA CONCI MACEDO², GLÉIA C. LAVERDE RICCI³

1. Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade Ingá; 2. Doutoranda em Biociência e Fisiopatologia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Docente da Faculdade Ingá (UNINGÁ); 3. Mestre em Genética em melhoramentos e doutora em Biologia Celular e Molecular ambos pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Docente da Faculdade Ingá (Uningá), Maringá-Pr.

*Av. Mario Caplier Urbinatti, 488, zona 7, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-2060. daniafecchio@hotmail.com

Recebido em 11/11/2014. Aceito para publicação em 27/11/2014

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo destacar a importância do uso da terapia gênica no tratamento de doenças. Trata-se de uma revisão de literatura, onde foram utilizados artigos científicos, periódicos de revistas e livros. A Terapia Gênica é o procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes selvagens para substituir genes mutados. Resumidamente, as etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica são: o isolamento do gene de interesse, a construção de um vetor para transferência do gene para a célula-alvo, e as técnicas de transferência do gene. A utilização da terapia gênica como forma de tratamento está relatada nas doenças como Imunodeficiência Severa Combinada, câncer, doenças cardiovasculares, doença de Parkinson e cancro de mama. Novas pesquisas ainda são necessárias para aplicação dessa metodologia em doenças a fim de obter um tratamento de sucesso.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia gênica, tratamento, doenças.

ABSTRACT

The present study aims to highlight the importance of the use of gene therapy to the treatment of diseases. It was based in literature review, scientific journals, periodicals and books. The gene therapy is the procedure to introduce an organism using recombinant DNA techniques, wild genes to replace mutated genes. Briefly, the steps involved in an experiment of gene therapy are: isolation of the interest gene, vector construction for gene transfer to the target cell, and the techniques of gene transfer. The use of gene therapy as a treatment is reported in Severe Combined Immunodeficiency diseases such as, cancer, cardiovascular disease, Parkinson's disease and breast cancer. Further research is still required for the application of this methodology in diseases in order to get a successful treatment.

KEYWORDS: Gene therapy, treatment, diseases.

1. INTRODUÇÃO

Desde sua criação, por Johann Gregor Mendel, em meados do século XIX, até os dias atuais, a genética evoluiu extraordinariamente, seus trabalhos realizados são hoje tão atuais como no momento de sua publicação, conquistando um lugar de destaque entre as ciências¹.

A genética é fundamental para as ciências básicas da educação médica pré-clínica, e tem importantes aplicações para medicina clínica, saúde pública e pesquisa médica. A genética atingiu um papel reconhecido como a especialidade que lida com o diagnóstico, o tratamento e o controle dos distúrbios hereditários².

Algumas pesquisas foram realizadas por médicos geneticistas, uma delas foi o Projeto Genoma Humano, que tem por objetivo identificar todos os genes responsáveis por nossas características normais e patológicas, visando revolucionar a medicina principalmente na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças³.

Em parceria com outras disciplinas da biologia moderna e com o projeto genoma concluído, favoreceu-se a compreensão de muitas doenças, promovendo o desenvolvimento de meios melhores de diagnóstico, medidas preventivas e métodos terapêuticos, que contribui para a saúde e doença. Foi um feito grandioso que promete acelerar o progresso da biologia e da medicina do século XXI².

Foi a partir da década de 1940 que a genética tomou grande impulso, as descobertas sobre a natureza, a composição química e as propriedades do material genético, assim como as primeiras manipulações do DNA de bactérias, começaram a gerar grandes expectativas para avanços terapêuticos. Em meados da década de 1960, começou-se a especulação sobre a possibilidade de utilizar vírus para transferir genes a seres humanos doentes e curar doenças genéticas⁴.

Algumas descobertas foram importantes em áreas de

investigação destinadas ao desenvolvimento de novos tratamentos para doenças ainda incuráveis vem sendo estudadas, levando em consideração, que a expectativa de curar doenças genéticas repousa sobre a identificação de genes responsáveis por sua patogênese e sobre o avanço das tecnologias de DNA recombinante, ou “engenaria genética”, que permitem a manipulação do genoma de forma cada vez mais eficiente e segura⁵.

Em 1990, começava o surgimento da terapia gênica, ou seja, o procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes selvagens para substituir, genes mutados⁶.

A terapia gênica é a esperança de tratamento para um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos convencionais, das hereditárias e degenerativas às diversas formas de câncer e doenças infecciosas. Este tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre a utilização da terapia gênica no tratamento de doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo realizado com base em uma revisão de literatura, em que foram consultados em artigos disponíveis online nas bases Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Library of Medicine (MEDLINE), utilizando-se as palavras-chave: terapia gênica, tratamento e doenças. Outras publicações direcionadas também foram utilizadas, como tese e livros.

3. DESENVOLVIMENTO

Terapia gênica

A Terapia Gênica ou geneterapia é o tratamento, ou a sua tentativa, de doenças genéticas, hereditárias e adquiridas por meio da introdução, em células específicas do paciente, de cópias de genes com objetivos terapêuticos. Assim, terapia gênica é o uso de genes ao invés de drogas para tratamento de doenças⁷.

As doenças genéticas são causadas por mutações nos genes, o gene é a unidade física e funcional fundamental da hereditariedade. Um gene é uma sequência ordenada de nucleotídeos localizada em uma posição particular em um cromossomo particular que codifica um produto funcional específico. Ou seja, o gene é um segmento de DNA que contém instruções capazes de codificar uma proteína⁸.

O conhecimento dos genes responsáveis por características normais ou patológicas permite a aplicação dos princípios da medicina genômica, que deverá modificar os procedimentos médicos no diagnóstico e tratamento de várias doenças e onde se inclui a terapia gênica. A introdução de um gene normal poderá reverter o quadro clínico, em vários outros tipos de doenças, as células geneticamente modificadas poderão ativar mecanismos

de defesa naturais do organismo como o sistema imune ou produzir moléculas de interesse terapêutico⁹.

Vetores e métodos de transferência de genes

A entrada de DNA puro através da membrana plasmática de células eucarióticas é extremamente rara. Essa dificuldade é, naturalmente, benéfica para o organismo, pois dificulta alterações espúrias do metabolismo celular e até mesmo transformações semelhantes às que se observam na evolução das espécies. Por conseguinte, de modo geral, há necessidade de um carreador que facilite a entrada do DNA nas células vivas. Esse veículo é denominado “vetor”¹⁰.

A palavra vetor, que deriva do latim vector (aquele que carrega, entrega) define o agente que constitui ou contém os genes a serem transferidos e expressos em uma célula receptora. Os diversos tipos de vetores são utilizados com o objetivo de levar o gene selvagem ao núcleo das células-alvo¹¹.

Antes de serem introduzidos no paciente, os vírus usados como vetores sofrem várias alterações genéticas, de modo que o gene terapêutico é inserido, enquanto diversos outros genes que lhe conferem virulência são retirados ou inativados. Assim, ao se ligar e invadir a célula-alvo, os vetores virais injetam seu material genético contendo o gene terapêutico no DNA do paciente, possibilitando a transcrição e tradução do gene para sua proteína funcional correspondente, ou então utilizam a maquinaria molecular da célula hospedeira para expressar seus genes¹².

O vetor ideal deve ser de fácil produção, não deve gerar resposta imunológica ao vírus ou ao transgene pelo paciente, deve promover a expressão do transgene de modo eficiente e por longo tempo, além de, se possível, ter especificidade na célula-alvo¹³.

O princípio da produção de vetores de origem viral para terapia gênica consiste em remover os genes envolvidos nos mecanismos patogênicos e de proliferação viral, mantendo apenas o necessário para invasão das células sem multiplicação, seguida da inserção de um gene terapêutico no que resta do DNA viral¹⁴.

Os vetores virais utilizados na terapia gênica são utilizados conforme a patologia do indivíduo, estes vetores são classificados como vetores adenovirais, retrovírus e adeno-associados. Os adenovírus são bastante utilizados principalmente devido à pouca patogenicidade e ao tropismo amplo por células humanas. No entanto, a grande imunogenicidade e a expressão gênica transiente relacionada a estes vetores limitam suas aplicações. Atualmente, os adenovírus têm uma aplicação importante na transferência de genes suícidas a tumores⁹.

Os vetores retrovirais permitem a integração do transgene no genoma da célula hospedeira, restaurando a deficiência celular de um modo que pode ser permanente. No entanto, a eficiência na produção de retrovírus re-

combinantes é baixa, o que limita a possibilidade de seu uso, e a inserção no genoma não impede o silenciamento posterior da expressão do transgene¹⁵.

Os vírus adeno-associados (família Parvoviridae) possuem algumas vantagens em relação aos demais sistemas virais, como integração sítio-específica, tropismo ampliado e ausência de patogenicidade. No entanto, a limitação do tamanho do transgene carreado, a necessidade de vírus auxiliares para a produção destes vetores e, em certos casos, a perda da capacidade de integração sítio-dirigida têm limitado a utilização destes vetores⁹.

A escolha da célula-alvo para introdução do gene é de grande importância, é preciso que a célula tenha uma meia-vida longa in vivo ou um potencial replicativo significativo, de modo que o efeito biológico da transferência possa ser de duração útil, como as células-tronco, a introdução dos genes nessas células pode resultar na expressão do gene transferido em uma grande população de células filhas².

A inserção do gene terapêutico pressupõe sua introdução por meio de vetores de transferência que sejam capazes de reconhecer as células-alvo. Os sistemas de inserção de material genético podem ser através das técnicas, *ex vivo* e *in vivo*¹⁶.

Na técnica *ex vivo*, retiram-se células do paciente, faz-se cultura das mesmas, usam-se vetores para nelas inserir o gene previamente isolado e engenheirado, e, por infusão, essas células tratadas são levadas de volta ao paciente. As células da medula são as mais usadas em terapia *ex vivo*, embora existam testes em outros tipos de células. Na técnica *in vivo*, o gene engenheirado é levado diretamente ao organismo do paciente, também usando vetores, porém dispensando a retirada de células e sua subsequente reintrodução no paciente⁷.

Os métodos de transferência gênica são geralmente divididos em três categorias: métodos físicos (o transgene é introduzido de maneira mecânica nas células), métodos químicos (o vetor é alguma substância de origem química) e métodos biológicos (emprego de organismos que naturalmente possuem a capacidade de transferir material genético, como os vírus ou algumas bactérias). A escolha do método a ser empregado é feita de acordo com a patologia, a célula ou tecido-alvo, o tamanho e tipo de transgene a ser expresso e o tempo e quantidade de expressão que se deseja obter, entre outros fatores⁹.

Os métodos físicos são utilizados para introdução principalmente de plasmídeos em células, já que o DNA transferido por esses métodos encontra-se preferencialmente nesta forma¹¹.

Os métodos químicos utilizam características do DNA e das membranas celulares para, utilizando compostos químicos, garantir a entrada de material genético nas células⁹.

De todos os sistemas de transferência gênica, os virais são os atualmente mais utilizados nos estudos para

desenvolvimento de protocolos de terapia gênica, devido principalmente à alta eficiência de transdução obtida com estes vetores. Todos os sistemas virais utilizados trabalham com vírus deficientes em replicação, que são capazes de transferir seu material genético para células-alvo, mas não conseguem replicar-se e continuar seu ciclo infeccioso¹⁷.

Em contraposição à resistência da membrana celular à entrada espontânea de DNA em uma célula, os vírus são micro-organismos especializados exatamente em invadir células e nelas introduzir material genético. Contêm ácido nucleico (DNA ou RNA) cercado por uma capa de proteína e, em alguns casos, de um envelope adicional de proteína e lipídeos e seu ciclo de vida implica liberação do ácido nucleico viral na célula hospedeira. Essa propriedade é explorada para introduzir genes terapêuticos nas células, por meio de tecnologias de DNA recombinante¹⁸.

4. DISCUSSÃO

A terapia gênica pode ser classificada em duas categorias: terapia gênica somática e terapia gênica germinal. Na terapia gênica somática o material genético é inserido em células-alvo selecionadas, mas a informação genética não é passada para a próxima geração, ao contrário do que acontece na terapia gênica germinal. Esta classificação é de extrema importância uma vez que, até aos dias de hoje, a lei N.º 12/2005 de 26 de janeiro (artigo n.º 8), apenas permite terapia gênica em células somáticas¹⁹.

O primeiro protocolo de terapia gênica em humanos foi realizado em 1990 nos Estados Unidos, em duas crianças portadoras da imunodeficiência combinada severa. A doença está relacionada com o defeito no gene ADA que codifica a enzima adenosina desaminase, onde sua função é catabolizar a adenosina em inosina. A mutação do gene ADA leva a deficiência da enzima ADA e acúmulo de dATP que por sua vez, inibe a atividade da ribonucleotídeo difosfato redutase, uma enzima importante para a síntese de DNA e RNA. Os linfócitos, como todas as células, requerem uma grande quantidade de DNA e RNA durante a proliferação. O acúmulo de dATP nessas células leva a morte precoce dos linfócitos e consequentemente a Imunodeficiência Severa Combinada. O tratamento para essa doença é realizado através de injeções semanais de reposição da enzima ADA, até ser realizada a terapia gênica²⁰.

A cada um ou dois meses, os pesquisadores retiravam células T do sangue da criança e inseriam o gene da ADA, induziam a proliferação dessas células no laboratório e, então, devolviam as células tratadas para o sangue da paciente, depois de sete infusões, houve uma pausa de seis meses, e, a partir daí, as infusões recomeçaram até o tratamento completar dois anos. Por segurança, a menina continuou a receber as injeções sema-

nais da enzima. A terapia gênica dessa paciente, bem como a realizada a partir de 1991 em uma segunda paciente de nove anos de idade, teve resultados positivos. Houve melhora clínica com uma redução da quantidade de enzima que era necessário repor. Observou-se que os níveis da enzima no sangue das pacientes aumentaram progressivamente com a terapia gênica e se mantiveram estáveis no intervalo de descanso de seis meses e finalmente, doze anos após terminarem as infusões, época em que foi feita uma reavaliação dos dois casos, grandes números de células T continuaram expressando o gene terapêutico no sangue da primeira paciente, cujo tratamento foi mais bem-sucedido do que o da segunda²¹.

A terapia gênica com o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) representa um potencial alternativo de tratamento para angina refratária, pela possibilidade do desenvolvimento de circulação colateral e melhora da perfusão miocárdica. O VEGF funciona tanto como um importante marcador de dano endotelial quanto como mediador de reparo. Em casos de injúria como isquemia, inflamação e infarto tem sua expressão aumentada e estimula a manutenção, mobilização e recrutamento das células progenitoras endoteliais da medula óssea²².

Com intuito de induzir a angiogênese miocárdica, a terapia gênica utilizando o VEGF poderia representar uma nova modalidade de tratamento para a DAC (doença arterial coronariana). Isso se deve à possibilidade de desenvolver novos vasos arteriais ou promover a reformação dos vasos existentes²³.

A terapia gênica em doenças cardiovasculares não visa a substituir um gene anormal, mas supra-regular a expressão de uma proteína útil aumentando o conteúdo de DNA. Sua efetividade depende do gene, do vetor e da forma de administração utilizados²⁴.

A terapia gênica, visando à proteção miocárdica, também pode ser útil na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Em estudos a administração do gene da heme-oxigenase com adenovírus ao coração de ratos antes do transplante levou ao aumento da sobrevivência do enxerto, prevenindo aterosclerose, inflamação e fibrose intersticial²⁵.

Para a terapia gênica em degenerações retinianas é desejável que o gene inserido se expresse por um longo tempo e tenha regulações apropriadas. Existem muitas degenerações retinianas monogênicas e algumas dessas doenças são candidatas à terapia gênica, pois, até o momento, ainda não há outro tratamento. O olho é um órgão peculiar para a terapia gênica, pois é anatomicamente dividido em compartimentos (situação ideal para inserção precisa do vetor no tecido de interesse), imunologicamente privilegiado e com meios transparentes. A maioria das doenças oculares tem defeitos em genes conhecidos e tem progressão lenta permitindo maior tempo para tratamento²⁶.

Para terapia gênica no tratamento do câncer o efeito

desejável é o de provocar a morte seletiva das células tumorais, as células cancerosas geralmente multiplicam-se com rapidez, o que explica o crescimento dos tumores²⁷.

O tratamento funciona da seguinte forma, o neurocirurgião remove o máximo possível do tumor, restando células tumorais dispersas entre os neurônios normais do cérebro. O gene terapêutico (HSV-TK ou timidina cinase) é injetado na região operada, penetrando nas células nas células e comandando a produção da enzima. Essa enzima fosforila o ganciclovir injetado, transformando-o em uma toxina poderosa que se incorpora ao DNA das células-alvo, bloqueando a replicação do DNA e levando, eventualmente, à morte da célula proliferante⁶.

A Doença de Parkinson é caracterizada por perda progressiva de neurônios na parte compacta da substância negra do mesencéfalo e alterações funcionais em outros núcleos do tronco cerebral, acompanhada da formação de inclusões intracelulares denominadas corpos de Lewy. Isso resulta em depleção de dopamina, o neurotransmissor utilizado pelos neurônios que degeneram no alvo dos prolongamentos dos neurônios da substância negra, que se chama corpo estriado. Com a evolução da doença, encontra-se adicionalmente o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores. Os distúrbios motores típicos da doença, como tremor de repouso, lentidão dos movimentos e rigidez muscular, são frequentemente acompanhados por instabilidade postural, disfunção visceral e distúrbios cognitivos²⁸.

As estratégias de terapia gênica para tratamento da doença de Parkinson incluem a indução da produção local de dopamina no estriado, a oferta de fatores neurotróficos para reduzir a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos ou, ainda, a compensação do desequilíbrio funcional na rede de comunicação celular dos núcleos da base²⁹.

A terapia gênica no cancro de mama tem como objetivo abranger a indução de alterações no crescimento e comportamento celular, tal como a inibição da proliferação e da invasão ou capacidade metastática das células cancerígenas³⁰.

Uma das estratégias para a transferência de genes no cancro de mama envolve a reposição do gene supressor de tumor mais comumente alterado nesse caso como o p53³¹.

A transferência do p53 foi testada utilizando vetor adenoviral e revelou ser capaz de reverter a resistência de células MCF-7 multi resistente a drogas, à adriamicina, provavelmente por um processo associado a inibição de glicoproteínas de permeabilidade e indução à apoptose³².

A transferência do gene p53 também foi realizada utilizando vetores retrovirais e lipossomas em células com cancro de mama humano também se tem revelado o suficiente para reduzir o tumor³³.

A terapia gênica consiste de várias abordagens para o tratamento de doenças humanas ou na correção de qualquer disfunção no organismo, que dependem da transferência do material genético exógeno para as células de um indivíduo com o objetivo de corrigir ou eliminar as causas de patologia que envolva fatores genéticos como doenças neoplásicas, hereditárias, degenerativas e infecciosas³⁴.

5. CONCLUSÃO

Através do estudo realizado podemos compreender que a terapia gênica tem como finalidade a correção de um defeito no gene que causa doenças e tem se mostrado eficaz no tratamento de alterações gênicas em modelos animais, mas muitas barreiras ainda necessitam ser transpostas para que sejam alcançados resultados satisfatórios. Os métodos de transferência gênica disponíveis, ainda que variados, são pouco eficientes e apresentam sérias limitações quanto ao direcionamento celular, podendo ter efeitos adversos nos portadores de doenças. Ainda com obstáculos impostos o que se espera é ultrapassar esses limites e obter o tratamento de doenças através da terapia gênica. Assim, novas pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de aplicar essa metodologia no tratamento de diversas doenças, para obter um tratamento de sucesso.

REFERÊNCIAS

- [1] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. Macmillian Magazines Ltd.; 2001 Feb 15 [cited 2014 Jul 10];409(6822):860–921. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/35057062>
- [2] Thompson. *Genética Médica*. *Genética Médica*. 2002. p. 237–8.
- [3] Zatz M. Projeto genoma humano e ética. *São Paulo em Perspectiva*. 2000;47–52.
- [4] Friedmann T. The road toward human gene therapy--a 25-year perspective. *Ann Med* [Internet]. 1997 Dec [cited 2014 Oct 29];29(6):575–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562527>
- [5] Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA, Freeman WH. *Recombinant DNA: genes and genomics: a short course*. 2007.
- [6] Linden R. *Genes contra doenças. Terapia gênica: Uma nova era na genética*. 2008.
- [7] Azevêdo ES. *Terapia Gênica*. *Rev Bioética*. 2009;5(2):5.
- [8] Joaquim LM, El-Hani CN. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. *Sci Stud*. 2010;8(1):93–128.
- [9] Nardi NB, Teixeira LAK, Silva EFA. *Terapia gênica. Ciência e Saúde Coletiva*. 2002;1(7):109–16.
- [10] Vellai T, Vida G. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc Biol Sci* [Internet]. 1999 Aug 7 [cited 2014 Oct 29];266(1428):1571–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661569>
- [11] Dani SU. The challenge of vector development in gene therapy. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 1999 Feb [cited 2014 Oct 29];32(2). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1999000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- [12] Artioli G, Hirata R, Junior A. *Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro*. *Rev Bras Med do ...* [Internet]. 2007 [cited 2014 Oct 29];13(5):349–54. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbme/v13n5/13.pdf>
- [13] Menck CFM, A M Ventura. *Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica*. *Rev USP*. 2007;(75):51–61.
- [14] Merten, Otto-Wilhelm, Al-Rubeai M. *Viral Vectors for Gene Therapy - Methods and Protocols* [Internet]. 2011 [cited 2014 Oct 29]. Available from: <http://www.springer.com/biomed/human+genetics/book/978-1-61779-094-2>
- [15] Frederico C, Menck M. *Manipulando genes em busca de cura : o futuro da terapia gênica*.
- [16] Karthikeyan B V, Pradeep AR. *Gene therapy in periodontics: a review and future implications*. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2014 Oct 29];7(3):83–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820811>
- [17] Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* [Internet]. 2000 Jan [cited 2014 Oct 29];18(1):19–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661569>
- [18] Linden R. *Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. Estud Avançados*. 2010;24(70):31–69.
- [19] BRASIL. *Lei N.º 12/2005 26 de Janeiro. Informação genética pessoal e informação de saúde*. Brasil: Assembléia da República; 2005.
- [20] Lopes AC. *Diagnóstico e Tratamento*. 3rd ed. Manole; 2007.
- [21] Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long Z, et al. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2014 Oct 29];101(7):2563–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456496>
- [22] Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2008 May 6 [cited 2014 Oct 29];51(18):1760–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452782>
- [23] Giusti II. *TERAPIA GÊNICA PARA ANGIOGÊNESE NA ANGINA REFRACTÁRIA: ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO FASE I / II*. 2011. p. 84.
- [24] Kalil RAK, Tofani R, Anna S, Cardiologia FUDE, Isabel AP, Porto S, et al. *SOCIEDADE de CARDIOLOGIA do RIO GRANDE DO SUL*. 2004;1–7.

- [25]Tsui T-Y, Wu X, Lau C-K, Ho DWY, Xu T, Siu Y-T, et al. Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation* [Internet]. 2003 May 27 [cited 2014 Oct 29];107(20):2623–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732603>
- [26]Côco M, Han SW, Sallum JMF. Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72(4):560–6.
- [27]Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* [Internet]. Elsevier; 2002 Feb 2 [cited 2014 Oct 29];1(1):19–30. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610802000247/fulltext>
- [28]Guttman M, Kish SJ, Furukawa Y. Current concepts in the diagnosis and management of Parkinson's disease. *CMAJ* [Internet]. 2003 Mar 4 [cited 2014 Oct 29];168(3):293–301. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=140472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [29]Chen Q, He Y, Yang K. Gene therapy for Parkinson's disease: progress and challenges. *Curr Gene Ther* [Internet]. 2005 Mar [cited 2014 Oct 29];5(1):71–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15638712>
- [30]Coimbra UDE. Desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para cancro da mama , envolvendo a acção combinada de terapia génica e. 2013;
- [31]Stoff-Khalili MA, Dall P, Curiel DT. Gene therapy for carcinoma of the breast. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2006 Jul [cited 2014 Oct 29];13(7):633–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1781527&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [32]Qi X, Chang Z, Song J, Gao G, Shen Z. Adenovirus-mediated p53 gene therapy reverses resistance of breast cancer cells to adriamycin. *Anticancer Drugs* [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 Oct 29];22(6):556–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637162>
- [33]Nielsen LL, Dell J, Maxwell E, Armstrong L, Maneval D, Catino JJ. Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts. *Cancer Gene Ther* [Internet]. [cited 2014 Oct 29];4(2):129–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080122>
- [34]Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* [Internet]. 2007 Oct [cited 2014 Oct 29];9(10):833–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721874>

