Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças

Cláudia D. da Silva[1,2], Úrsula da Silveira Matte[3,4], Roberto Giugliani[3,5]

A terapia gênica está baseada no conceito de que uma doença genética pode ser corrigida pela substituição ou adição do gene defeituoso. Muita expectativa foi gerada pelos primeiros protocolos, mas o surgimento de complicações inesperadas levou a uma diminuição do entusiasmo inicial. Neste artigo, é feita uma revisão dos diferentes tipos de vetores utilizados para terapia gênica, com discussão das suas vantagens e desvantagens. Além disso, as estratégias para alguns dos principais tecidos alvo são discutidas. Especial ênfase é dada às estratégias para o tratamento do câncer, área na qual atualmente se concentram a maioria dos protocolos clínicos e que apresenta dificuldades menores do que as envolvidas no tratamento de doenças monogênicas.

Unitermos: Terapia gênica; vetores virais; vetores não virais; câncer.

Gene Therapy: a new strategy for the treatment of diseases

Gene therapy is based on the simple concept that a genetic disease can be corrected by replacing the defective gene. Early trials encountered unforeseen complications and much of the initial enthusiasm dismayed. This paper is a review about different kinds of vectors, their advantages and disadvantages. Strategies for different target tissues is also discussed. Special interest is on strategies for the treatment of cancer, since nowadays this is the area of most clinical trials. The reason is that cancer treatment proved less complex than treatment of monogenic life-treating disorders.

Key-words: Gene therapy; viral vectors; non-viral vectors; cancer.

Revista HCPA 2001(3)379-386

Introdução

O termo terapia gênica pode ser definido como a transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo de conferir um benefício terapêutico. O princípio da terapia gênica baseia-se no entendimento de que um gene ou vários genes estão defeituosos ou mutados. Este defeito acarreta a produção descontrolada ou a supressão de uma proteína

1 Laboratório Central de Saúde Pública, Secretaria da Saúde do RS.
2 Universidade Luterana do Brasil.
3 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
4 Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
5 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

essencial para o funcionamento normal das células. A terapia gênica é a esperança de tratamento de um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos tradicionais.

O primeiro protocolo clínico foi desenvolvido por French Anderson e sua equipe em 1990, para o tratamento de uma imunodeficiência grave causada pela ausência da enzima adenosina deaminase. O protocolo envolveu a retirada de células da medula óssea da paciente que foram infectadas com retrovírus modificado, contendo o gene de interesse (ADA), e a seguir foram re-introduzidas no organismo. A primeira paciente tratada com essa abordagem apresentou uma significativa melhora dos sintomas gerados pela doença (1).

A euforia inicial sobre as aplicações rápidas da terapia gênica, entretanto, foi gradualmente sendo substituída por cautela e pela constatação de que o desenvolvimento efetivo da terapia gênica é tecnicamente muito mais exigente do que originalmente antecipado. As pesquisas nessa área encontram-se atualmente em fase de aperfeiçoamento técnico. Duras lições foram aprendidas ao longo de 10 anos de estudo, desencadeando a proposição de novos rumos, e o sentimento de que houve grandes ensinamentos, principalmente nas pesquisas básicas de muitas doenças. Os cientistas têm trabalhado muito no sentido de tentar aprimorar os vetores de expressão hoje existentes, de maneira a aumentar a eficiência da transferência e dos níveis de expressão gênica, além de diminuir a imunogenicidade causada por alguns.

Atualmente, existem aproximadamente 450 protocolos clínicos de terapia gênica em andamento (2). A tabela 1 mostra o amplo espectro de doenças para as quais estão sendo desenvolvidos estudos clínicos, juntamente com o número de protocolos e o número de pacientes envolvidos. Aproximadamente 2/3 dos protocolos estão direcionados para o tratamento do câncer e muitas das doenças restantes, como as monogênicas e as infecciosas, estão voltadas, respectivamente, para o tratamento de fibrose cística e HIV.

Métodos de transferência

Basicamente três métodos de transferência gênica foram desenvolvidos: vetores virais, vetores não virais e métodos físicos. Os métodos físicos mais importantes envolvem microinjeção e eletroporação dos vetores plasmidias (DNA nu).

Vetores não virais

Os DNAs contendo genes terapêuticos podem ser introduzido nas células, utilizando-se vesículas fosfolipídicas sinteticamente produzidas, chamadas de lipossomos. A composição dessas moléculas assemelha-se à da membrana celular. Os lipossomos, portanto, criam uma via de passagem dos genes para dentro da célula. Os genes transferidos por

Tabela 1. Doenças, número de protocolos e número de pacientes envolvidos em estudos clínicos de terapia gênica

Doença	n protocolos	n pacientes
Câncer	331	2.361
Doenças monogênicas	71	309
Doenças infecciosas	36	408
Doenças cardiovasculares	36	59
Outras	8	19
Total	482	3.156

www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical

vetores não virais se integram facilmente em cromossomos de células em cultura de laboratório, mas esse fenômeno ocorre raramente *in vivo.* Essas moléculas lipídicas são fáceis de serem produzidas, são seguras, não provocam reações imunológicas e podem abrigar DNAs com tamanhos de até 48 Kb. Apesar dessas vantagens, apresentam uma baixa eficiência de transferência *in vivo* e podem ser destruídas por nucleases celulares (3).

Vetores virais

A maioria dos protocolos, entretanto, utilizam vetores virais (2). Muitos tipos de vírus foram adaptados para servir como vetores de transferência gênica. Os vetores virais mais utilizados em terapia gênica são: retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociado. Esforços substanciais têm sido empregados no desenvolvimento dos poxivírus e do vírus herpes simples. A tabela 2 mostra tipos de vetores e número de protocolos que os empregam.

A utilização de vírus como vetores apresentam as maiores vantagens e também as maiores desvantagens para terapia gênica. Dentre as vantagens, pode-se salientar o fato de serem vetores naturais de transferência de genes e que resistem à degradação. Possuem, entretanto, maior potencial para induzir uma resposta imune, sendo considerados mais prejudiciais ao organismo.

Tabela 2. Tipos de vetores usados em terapia gênica e número de protocolos

Vetores	n protocolos
Retrovírus	204
Adenovírus	136
Lipofecção	068
DNA nu	045
Poxivírus	034
Adenoassociado	010
Biobalística	005
Transferência de RNA	005
Herpes simples	003
Total	510

www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical

Os vírus utilizados em terapia gênica são modificados para que percam sua capacidade replicativa. Eles são produzidos em cultura de células especializadas, chamadas de células empacotadoras. Essas são células especificamente criadas para prover as funções removidas do vírus selvagem, empacotando o vetor viral com as proteínas capazes de infectar a célula uma única vez. As células empacotadoras possuem os genes *gag*, *env* e *pol* inseridos estavelmente em diferentes regiões de seus cromossomas, o que assegura que a recombinação desses genes seja improvável. O cuidado na produção dos vírus empacotados por essas células é essencial para que não resgatem a habilidade de criar novas partículas virais infectivas (4).

Os vetores retrovirais são os mais bem estudados e podem infectar até 100% de células em cultura que estão em divisão. Os retrovírus são vírus dupla fita de RNA que replicam após integração do material genético no genoma hospedeiro. Antes do retrovírus ser utilizado como vetor, os genes *gag* (codifica proteínas estruturais internas), *pol* (codifica a transcriptase reversa) e *env* (codifica o envelope viral formado por glicoproteínas), que perfazem 80% de seu genoma, são retirados e substituídos pelo gene terapêutico e por um gene que permite a seleção das células transfectadas. Desta maneira, um vírus selvagem é convertido em um vetor de terapia gênica seguro. A principal vantagem do emprego de vetores retrovirais está relacionada com a capacidade de integrarem seus genes no cromossoma da célula hospedeira, possibilitando a manutenção da expressão gênica por longo tempo. Entretanto, essa integração é ao acaso, o que pode interromper um gene essencial ou mesmo ativar um oncogene. A chance de ocorrência de mutagênese insercional é baixa, mas não deve ser descartada. Além disso, infectam somente células em divisão. Essa "limitação" tem sido explorada na terapia gênica para o câncer, permitindo a infecção específica das células tumorais que apresentam uma taxa de divisão muito maior do que as células normais.

Até pouco tempo o vetor retroviral mais bem estudado em terapia gênica era de origem murina, o MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*), que possui um genoma relativamente

simples. Recentemente, o mais novo membro da família dos retrovírus que tem sido explorado para uso em terapia gênica é o HIV, classificado como um lentivírus.

A manipulação de vetores derivados no HIV abriu novas perspectivas para o tratamento de uma ampla variedade de doenças, uma vez que possuem a capacidade de infectar tanto células em divisão quanto células que não se dividem. Esse tipo de vetor tem apresentado bons resultados em estudos pré-clínicos, com expressão sustentada e sem estimular o sistema imune. O genoma do HIV é considerado o mais complexo dentro da família dos retrovírus. Além dos genes *gag, pol* e *env* existem ainda genes que codificam as proteínas *Vpr, Vif, Vpu, Nef* e *Tat*, todas cruciais para a virulência do HIV. Esses genes podem ser retirados, sem alterar a performance do vírus, de modo que o vetor possua mínimas seqüências do vírus selvagem. Uma das recomendações no uso de vetores derivados de HIV é que se utilize proteínas heterólogas para o "encapsidamento" do vetor, ou seja, proteínas estruturais de outros tipos virais. O uso das proteínas heterólogas aumenta o tropismo do vetor pelo tecido e torna impossível a geração de vírus selvagens durante a produção do vetor nas células empacotadoras (5). Em um estudo utilizando vetores lentivirais para tratamento de fibrose cística foi possível observar que a incorporação no envelope de proteínas G, derivadas do vírus da estomatite vesicular, aumentou o tropismo do vetor às células do pulmão. Além disso, experimentos em camundongos também demonstraram altos níveis de transdução do gene CFTR utilizando-se essa abordagem (6).

Os vetores adenovirais são construídos com base nos adenovírus humanos, cujo material genético é formado por DNA. A maioria dos adenovírus selvagens apresenta as seguintes características: não causam doenças sérias, possuem a capacidade de carregar genes terapêuticos de tamanho grande e infectam células que não estão em divisão. Entretanto, os genes podem funcionar transitoriamente, pois são vetores que não se integram ao cromossoma da célula hospedeira, permanecendo no núcleo sob a forma de episssomos (livres). Além disso, são altamente imunogênicos (5).

Os vetores adenoassociados (AAV) pertencem à família dos parvovírus e não causam doenças humanas conhecidas. Combinam as principais vantagens desenvolvidas pelos adenovírus e retrovírus, pois infectam, tanto células em divisão, como células quiescentes. Além disso, podem integrar seus genes no cromossomo das células hospedeiras. O vírus selvagem possui tropismo pelo cromossomo 19 humano (5). Esse vetor foi empregado no tratamento da hemofilia B em modelos animais, demonstrando expressão estável do fator IX de coagulação e níveis eficientes de transdução (7). Sua principal desvantagem está relacionada com a capacidade de carregar apenas genes terapêuticos pequenos.

Os vírus herpes simples (HSV) são capazes de carregar genes para dentro de células nervosas, pois possuem tropismo pelo sistema nervoso central. Entre suas propriedades estão a habilidade de infectar células em divisão ou quiescentes, a capacidade de incorporar múltiplos genes terapêuticos e o fato de normalmente não integrarem seus genes nas células hospedeiras. O principal impedimento para o efetivo uso do HSV como vetor está na toxicidade residual das formas não replicantes. Além disso, provocam resposta imune, assim como os adenovírus (5).

A produção de vetores deve seguir normas rígidas de controle de qualidade e de biossegurança. Durante esse processo, é essencial que não existam partículas infecciosas, no caso do emprego de vetores virais, e que sejam realizados testes de integridade dos plasmídios, contendo o gene de interesse. É importante que o vetor escolhido não perturbe o funcionamento normal da célula e que as alterações provocadas sejam resultado somente da expressão do gene terapêutico (4). A escolha do tipo de vetor é freqüentemente ditada pela necessidade de uma expressão por um período duradouro ou transitório, bem como das características do tecido alvo. Finalmente, é importante salientar que não dispomos de um vetor ideal, todos os que estão em estudo apresentam vantagens e desvantagens.

Estratégias e tecidos alvo

Até agora, todos os estudos clínicos em andamento têm utilizado a estratégia da adição gênica em vez da correção ou troca de um gene defeituoso, sendo esta última tecnicamente mais difícil. Duas outras abordagens têm sido bastante

utilizadas em terapia gênica, o RNA *antisense* e as ribozimas. Os RNAs *antisense* possuem seqüências complementares a um RNA específico e, por isso se ligam a ele, bloqueando a tradução de uma proteína (8). Já as ribozimas são moléculas de RNA catalíticas que se ligam ao RNA alvo de maneira sítio-específica, provocando a dissociação desse último. As ribozimas são moléculas capazes de degradar diferentes RNAs alvo (9). Assim como os RNA *antisense*, as ribozimas também possuem seqüências complementares ao RNA alvo da degradação. Esses RNAs catalíticos são naturalmente encontrados dentro das células desempenhando funções como: processamento do RNA, maturação do tRNA e degradação de RNAs defeituosos. Alguns protocolos clínicos utilizam essa abordagem para combater o vírus HIV. A transferência de ribozimas altera a expressão gênica do HIV, prevenindo sua disseminação. As ribozimas também têm sido utilizadas experimentalmente no tratamento da hepatite C (10) .

Atualmente, todos os protocolos clínicos aprovados envolvem a transferência de genes somente a células somáticas, já que o uso de células germinativas é objeto de consideráveis debates éticos (11). A transferência gênica para células somáticas pode ocorrer tanto *ex vivo,* como *in vivo.* A abordagem *ex vivo é* a mais freqüente e envolve a remoção de células dos pacientes, adição do vetor desejado em laboratório, e o retorno das células corrigidas ao paciente.

A escolha do tecido alvo é um dos pontos mais importantes a ser considerado no desenho de um protocolo de terapia gênica. O tecido alvo deve estar envolvido na sintomatologia da doença, ser acessível e compatível com o método de transferência gênica escolhido.

O trato respiratório é o tecido alvo para o tratamento de câncer de pulmão, fibrose cística e deficiência de alfa-1-anti-tripsina (12). Os principais vetores utilizados são adenovírus, AAV e lipossomos. Um dos principais inconvenientes do uso de vetores adenovirais e adenoassociados se deve ao surgimento de resposta imunológica. As células pulmonares, na sua maioria, não se dividem, portanto, o emprego de vetores retrovirais não é aconselhável.

A realização de terapia gênica para doenças que afetam o SNC representa um grande desafio, por diferentes razões. Em primeiro lugar, a maior parte dos vetores existentes é incapaz de cruzar a barreira hematoencefálica. Em segundo, o SNC compreende uma grande variedade de tipos celulares altamente diferenciados e que desempenham diferentes funções, sendo que certas doenças podem estar mais ligadas a uma área, enquanto outras são difusas. Outra dificuldade é que são células que não se dividem, sendo refratárias aos retrovírus. Além disso, não se obtém com facilidade um número suficiente de células nervosas para crescimento em cultura. Ainda assim, várias estratégias de transferência gênica têm sido propostas para o tratamento de doenças com envolvimento neurológico. Entre elas estão a injeção direta do vetor por estereotaxia (trepanação), uso de vetores derivados de herpes vírus (HSV) e tentativa de modificação de outras células, como macrófagos. Esses últimos são capazes de migrar até cérebro e corrigir o defeito gênico. Protocolos experimentais para o tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson e outras doenças neurodegenerativas, têm utilizado as técnicas descritas acima (13).

A possibilidade de retirada de hepatócitos para terapia gênica *ex vivo* e o fácil acesso ao fígado tornam esse órgão um alvo de escolha, não apenas para o tratamento de doenças que afetam diretamente os hepatócitos, como hipercolesterolemia familiar ou hemofilia, mas também para doenças que necessitam de liberação de proteínas na circulação sangüínea (14).

O tecido hematopoiético é o tecido mais acessível para a realização de qualquer tipo de terapia gênica. A principal abordagem utilizada prevê a transferência gênica para células totipotentes, almejando-se a correção definitiva. Avanços no entendimento sobre a biologia das células tronco hematopoéticas têm facilitado esta tarefa. Diferentes protocolos clínicos têm sido utilizados com essa abordagem para o tratamento de doenças monogênicas, infecciosas e câncer.

Com relação ao tecido muscular, a manipulação de mioblastos apresenta características favoráveis por serem células fáceis de cultivar e poderem ser modificadas *ex vivo.* Além disso, o tecido muscular é altamente vascularizado e de fácil acesso para injeção direta

de DNA, sendo utilizado para tratamento de distrofias musculares e doenças vasculares (15).

Desenvolvimento de protocolos

As pesquisas de terapia gênica devem obrigatoriamente passar por estudos pré-clínicos e clínicos (fase I, II, III, IV). Os estudos pré-clínicos são realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os dados *in vivo* são obtidos em animais. Nessa etapa, avalia-se principalmente a eficiência de transferência, toxicidade do produto gênico, biodistribuição do vetor, taxa de integração, níveis de RNA e proteínas produzidos. As avaliações *in vivo* podem ser analisadas através da expressão de genes marcadores sob controle de regiões regulatórias.

Após os testes pré-clínicos, a etapa seguinte prevê os estudos clínicos. Atualmente, mais de 3 mil pacientes estão sendo tratados com terapia gênica experimental. Estudos clínicos de fase I realizam os primeiros testes da nova droga e têm como objetivo avaliar a segurança e parâmetros farmacológicos básicos. Dado os aspectos éticos e de segurança envolvidos, somente pacientes com doenças graves são incluídos em estudos de terapia gênica de fase I. Nessa fase, não é avaliada a eficácia terapêutica, e sim a viabilidade e segurança, e estabelecida a dose aceitável (4). Em média 6 pacientes são envolvidos. Os estudos clínicos de fase II investigam a eficácia da terapia gênica nos pacientes e servem para acumular dados sobre a segurança. Em média 20 pacientes são recrutados nessa etapa.

Como a terapia gênica é uma área que apresenta muitas questões a serem resolvidas, as fases I e II costumam levar mais tempo do que as fases estabelecidas para avaliação de drogas terapêuticas tradicionais. Por isso, criou-se uma fase intermediária, chamada de fase I/II. Uma vez demonstrado o efeito terapêutico, em um número limitado de pacientes, segue-se para a fase III, onde então é envolvido um grande número de indivíduos. O objetivo é obter informações estatísticas para demonstrar a validade dos efeitos observados nos estudos de fase II, além de servir para comparar os efeitos do novo tratamento com as terapias tradicionais, se elas existirem. Esses estudos envolvem múltiplos centros de pesquisa internacionais. Até o momento, 5

Tabela 3. Estudos de terapia gênica em fase II

Doença	Vetor	Transferência gênica	Gene	Estratégia terapêutica
Câncer	Lipídios catiônicos	Células tumorais *in vivo*	HLA B7	Reforçar o sistema imunológico
Câncer	Lipídios catiônicos	Células tumorais *in vivo*	IL-2	Reforçar o sistema imunológico
Câncer	Adenovírus	Células tumorais *in vivo*	P53	Indução de apoptose
Câncer	Retrovírus	Células tumorais *in vivo*	Timidina quinase	Destruição através de atividade enzimática /ou pró-droga
Cãncer	Retrovírus	Células tumorais *ex vivo*	IL-12	Reforçar o sistema imunológico
Isquemia	DNA nu	Células musculares *in vivo*	VEGF	Estimulação da angiogênese
Fibrose Cística	Adenoassociado	Células do trato respiratório *in vivo*	CFTR	Prover a proteína funcional

protocolos clínicos atingiram a fase III. Nenhum protocolo clínico atingiu a fase IV que prevê um estudo epidemiológico a longo prazo. A tabela 3 mostra alguns exemplos notáveis de terapias que progrediram para a fase II e que estão apresentando dados de atividade biológica encorajadores.

Protocolos para o tratamento do câncer

Até o momento, a terapia gênica para câncer tem mostrado resultados mais promissores do que para as doenças herdadas. As razões para isso são: 1) não é preciso conhecer o gene causador da doença; 2) a expressão pode ser transitória; e 3) limitada ao tecido tumoral. Diferentes tipos de protocolos têm sido propostos, tais como imunoterapia, gene suicida, restauração da função de proteínas indutoras de apoptose, bloqueio da expressão de oncogenes e aumento da resistência a quimioterapia.

A imunoterapia é a estratégia mais utilizada e consiste em transferir genes, cujos produtos irão estimular o sistema imune a reconhecer o tumor. Os principais genes utilizados têm sido os que codificam interleucinas (16). A estratégia do gene suicida, segunda maior abordagem de terapia gênica para o câncer, prevê a inserção do gene da timidina quinase nas células tumorais (17). Esse gene é capaz de converter uma pró-droga não tóxica (ganciclovir), em uma espécie citotóxica, altamente potente (ganciclovir 3-P). A restauração da função de p53 é outra abordagem para o tratamento de câncer. A proteína p53 normal pode induzir apoptose em células transformadas, capacidade perdida, quando ocorrem mutações nesse gene. Observou-se que a introdução do gene p53 normal, mediado por retrovírus, pode suprimir o crescimento de tumor de pulmão humano, cujas linhagens celulares apresentaram p53 deletado ou com expressão anômala (18). Oligonucleotídeos *antisense* estão sendo usados para inibir a expressão de oncogenes e outras proteínas envolvidas na progressão do tumor. Finalmente, é possível introduzir genes, como o MDR-1(*multiple drug resistense*), em células hematopoiéticas normais, com o objetivo de protegê-las dos efeitos tóxicos da quimioterapia (19). Desta forma, é possível aumentar a dose e a freqüência da quimioterapia para alcançar a cura.

Segundo Steven Rosemberg, a terapia gênica representa uma quarta abordagem terapêutica no tratamento contra o câncer, depois da cirurgia, da radio e da quimioterapia. Para as doenças genéticas herdadas, entretanto, esta nova abordagem pode se constituir na primeira forma de tratamento disponível.

Conclusão e perspectivas

A terapia gênica é uma área fértil para pesquisa científica e há muita esperança de que se torne uma prática clínica importante nesse novo século, representando mudanças de paradigmas na medicina, com importantes repercussões para a sociedade. Sem dúvida, a revolução genômica também tem contribuído para que muitos genes que apresentam relação causal com determinadas doenças sejam futuramente alvo da terapia gênica. Quanto aos progressos nessa área, é importante salientar que o desenvolvimento de uma droga comum, desde o momento de sua concepção até a sua produção, leva pelo menos 10 anos de pesquisas, e que no caso da terapia gênica, apenas agora estamos a uma década de seu início.

Referências

1. Anderson F. The best of times, the worst of times. Science 2000;288:627-9.
2. www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical
3. Miller AD. Nonviral delivery systems for gene therapy. In: Lemoine NR, editor. Understanding gene therapy. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
4. Larrick JW, Burck KL. Gene Therapy. New York: Elsevier; 1991. p. 281.
5. Murphy SJ. Viral delivery systems for gene therapy. In: Lemoine NR, editor. Understanding gene therapy. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
6. Wang G, Sinn PL, McCray PB Jr. Development of retroviral vectors for gene transfer to airway epithelia. Curr Opin Mol Ther 2000;*2*:497-506.
7. Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. Mol Ther 2000;1:154-8.

8. Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. J Cell Physiol 1999;181:251-7.
9. James HA, Gibson I. The therapeutic potential of ribozymes. Blood 1998;91:371-82.
10. Welch PJ, Yei S, Barber JR. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. Clin Diagn Virol 1998;10:163-71.
11. Walters LR, Palmer JC. The Ethics of Human Gene Therapy. New York: Oxford University Press; 1997. p. 209.
12. Vassaux G. Gene therapy for monogenic diseases. In: Lemoine NR, editor. Understanding gene therapy. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
13. Baekelandt V, De Strooper B, Nuttin B, Debyser Z. Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. Curr Opin Mol Ther 2000;2:540-54.
14. Grompe M. Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. J Inherit Metab Dis 2001;24:231-44.
15. Rigg AS. Gene therapy for multifactorial genetic disorders. In: Lemoine NR, editor. Understanding gene therapy. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
16. Bennett JJ, Malhotra S, Wong RJ, Delman K, Zager J, et al. Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer. Ann Surg 2001;233:819-26.
17. Rivas C, Miller AR, Collado M, Lam EW, Apperly JF, Melo JV. Bcr-abl-expressing cells transduced with the hsv-tk gene die by apoptosis upon treatment with ganciclovir. Mol Ther 2001;3:642-52.
18. Swisher SG, Roth JA. Gene therapy in lung cancer. Curr Oncol Rep 2001;2:64-70.
19. Licht T, Goldenberg SK, Vieira WD, Gottesman MM, Pastan I. Drug selection of MDR1-transduced hematopoietic cells ex vivo increases transgene expression and chemoresistance in reconstituted bone marrow in mice. Gene Ther 2000;7:348-58.