



# Gastroenterología y Hepatología

www.elsevier.es/gastroenterologia



XXXV CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN/ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

## Terapia génica de las enfermedades hepáticas

J. Prieto\* y G. González-Aseguinolaza

CIMA y Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona, España

### Introducción

La terapia génica es una modalidad de tratamiento médico basada en la transferencia de genes a los tejidos, con la finalidad de que las propias células del órgano enfermo o el órgano diana sinteticen las moléculas capaces de mediar los efectos terapéuticos<sup>1</sup>. Se dice que una célula o tejido ha sido transducida cuando ha incorporado el gen exógeno (transgén) y comienza a producir la proteína terapéutica. Para conseguir la transducción celular es preciso empaquetar el transgén en construidos moleculares que le permitan atravesar la membrana citoplasmática y llegar al núcleo de la célula. A estos construidos moleculares se les denomina vectores de terapia génica, siendo los más comúnmente usados los basados en estructuras virales<sup>1-3</sup>.

Los vectores virales se generan seleccionando 1 o más genes del virus nativo, los cuales son sustituidos por el transgén<sup>4</sup>. Éste se utiliza normalmente en forma de ADN complementario (ADNc) codificante para la proteína terapéutica: el ADNc se introduce en el vector precedido por un promotor y seguido por una cola poliA; a este conjunto se le denomina casete de expresión<sup>5</sup>. El promotor puede ser universal o específico de tejido y pueden utilizarse promotores constitutivos o inducibles<sup>6</sup>. Los vectores virales se clasifican según la estructura viral en que se basan (adenovirales, retrovirales-lentivirales, adenoasociados [AAV], etc.)<sup>4</sup> y según la duración de la expresión del transgén en los tejidos transducidos. Hay vectores de expresión corta (como los adenovirus recombinantes de primera generación que permiten una expresión del transgén de alrededor de 1 semana)<sup>7</sup> y vectores de larga expresión (expresión durante meses o años o toda la vida) como los virus AAV, los adenovirus de tercera generación, también llamados adenovirus *gutless* o *helper*-dependientes y los retrovirus<sup>8-10</sup>. Los vectores también se pueden clasificar según se integren o no en el geno-

ma del huésped. Los adenovirus permanecen episómicos mientras que los retrovirus son vectores integrativos<sup>8-10</sup>. En cuanto a los AAV, mientras en su forma salvaje se integran de forma específica en el cromosoma 19, su versión recombinante tiene escasa capacidad de integración<sup>11</sup>.

La terapia génica es un procedimiento terapéutico de gran plasticidad que se puede utilizar tanto para las enfermedades genéticas hereditarias como para cuadros patológicos adquiridos, como enfermedades degenerativas, neoplasias, procesos inflamatorios crónicos o infecciones persistentes<sup>12,13</sup>. Cada aplicación requiere el uso de los vectores y transgenes adecuados que han de ser seleccionados según la estrategia terapéutica a utilizar. La administración del vector puede realizarse mediante administración directa del vector al paciente, terapia génica in vivo, inyección intravenosa o intralesional o mediante la transducción ex vivo de la población celular diana previamente extraída del paciente<sup>1</sup>. En este último caso pueden obtenerse las células del individuo enfermo, por ejemplo, células dendríticas o células progenitoras hematopoyéticas o células progenitoras endoteliales, y tras su transducción con el vector escogido, volver a inyectarlas en el paciente. Esta estrategia que combina terapia celular y génica es muy prometedora para el tratamiento de una gran variedad de procesos patológicos<sup>14-16</sup>.

### Transferencia génica para el tratamiento de las enfermedades del hígado

La terapia génica se puede contemplar para una amplia diversidad de enfermedades que afectan al hígado, y también para el tratamiento de cuadros clínicos en los que el hígado no está afectado pero es utilizado como maquinaria de síntesis de proteínas plasmáticas deficitarias. El tratamiento de la hemofilia B mediante terapia génica es un claro ejemplo de tratamiento desde el hígado de una enfermedad no hepática, en este caso se transduce el hígado con un vector

\*Autor para correspondencia

Correo electrónico: jprieto@unav.es (J. Prieto).

codificante para el factor IX de la coagulación, de forma que el hígado actúa como fuente del factor de coagulación<sup>17</sup>.

En el caso de las enfermedades hepáticas, la terapia génica se puede utilizar para el tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias, como la porfiria aguda intermitente (PAI)<sup>18</sup>, los tumores primitivos y metastásicos del hígado<sup>19-21</sup>, la hepatitis viral crónica<sup>22</sup> y la cirrosis hepática<sup>23</sup>. La combinación de terapia celular y génica se puede aplicar a las enfermedades hepáticas agudas severas y también puede resultar útil en el tratamiento de enfermedades crónicas como la cirrosis. Haremos una breve consideración de cada una de estas aplicaciones<sup>24</sup>.

### Terapia génica de la porfiria aguda intermitente

La PAI es una enfermedad metabólica hereditaria, que se caracteriza por una actividad reducida de la vía de la síntesis del heme debida a la deficiencia parcial del enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD). La enfermedad se hereda de modo autosómico dominante, y la mayor parte de los pacientes son heterocigotos, en homocigosis mutaciones en PBGD son normalmente letales<sup>25</sup>. En la PAI, la actividad de PBGD es de alrededor del 50% de la normal. Las crisis agudas de la enfermedad se presentan cuando los requerimientos de hemo aumentan por efecto de infecciones, administración de fármacos o alteraciones hormonales superando las posibilidades de síntesis. La activación de la vía metabólica comporta el acúmulo de precursores ALA y PBG que son responsables de los ataques neurovisceral y las alteraciones neurológicas (alteraciones psíquicas y polineuropatía) que presentan estos pacientes. En la PAI, la fuente principal de ALA y PBG es el hígado en los que la deficiencia de PBGD ocasiona el acúmulo de precursores de porfirinas en situaciones de aumento de demanda de heme<sup>25-27</sup>. La PAI es una enfermedad susceptible de terapia génica, ya que la transducción de los hepatocitos con un vector que exprese la versión correcta del enzima comportaría un aumento de actividad enzimática en hígado capaz de evitar las crisis agudas provocadas por la activación de la vía de la biosíntesis del heme<sup>18,28,29</sup>. Esta opción terapéutica estaría justificada para pacientes con crisis repetidas de ataques agudos severos o con neuropatía establecida. En nuestro grupo hemos mostrado que la transducción del hígado de ratones porfiricos con un vector AAV codificante para PBGD es capaz de evitar la acumulación de ALA y PBG en estos animales cuando se les provoca un ataque agudo mediante administración de fenobarbital. Asimismo, hemos observado que el tratamiento génico es eficaz en la prevención de la polineuropatía (Fontanellas et al, artículo en preparación).

### Terapia génica de la hepatitis viral crónica

La introducción de nuevos fármacos antivirales para la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) ha revolucionado el tratamiento de esta enfermedad, en la que la respuesta al interferón (IFN) es inferior al 30%, siendo mucho menor el porcentaje de respuestas en pacientes con alta viremia infectados en la infancia. Los análogos de nucleós(t)idos son altamente efectivos, pero su administración ha de ser continuada en el tiempo pues la interrupción

va seguida frecuentemente de rebrote de la replicación viral, al no inducir estos fármacos respuesta inmune contra antígenos del virus en la mayoría de los casos<sup>30,31</sup>. Por tanto, es deseable un tratamiento que sea eficaz en la supresión de la replicación del virus y en la estimulación de la respuesta inmune antiviral que permita la eliminación del agente infeccioso en un período corto.

Recientemente, se ha observado que la seroconversión a anti-e y la supresión de la replicación viral tras tratamiento con IFN- $\alpha$  van asociados a un pico de interleucina (IL)-12 en suero. Esta citocina juega un papel central en la orquestación de la respuesta inmune celular de tipo TH1 y en la activación de los linfocitos T citotóxicos, críticos para la eliminación de las células infectadas<sup>32</sup>. Es por tanto concebible que la inducción de la expresión de IL-12 en el propio hígado pueda facilitar la eliminación de la replicación viral. Para probar este concepto, se han utilizado marmotas con infección crónica por el virus de la hepatitis de la marmota (WHV, *woodchuck hepatitis virus*), un modelo que reproduce con notable similitud la hepatitis crónica B de alta viremia. El WHV tiene una alta homología con el VHB en su organización genética, en su estructura antigénica y en las características serológicas y evolutivas de la enfermedad hepática que origina<sup>33</sup>. Las marmotas infectadas en el período neonatal desarrollan tolerancia al virus, y la infección se hace crónica y se asocia a una alta carga viral y marcada resistencia al tratamiento con IFN- $\alpha$ <sup>34</sup>.

Para el tratamiento de estos animales hemos construido un vector adenoviral de tercera generación (*gutless*) de larga expresión codificante para IL-12 bajo el control de un promotor inducible y hepatoespecífico (gAdIL-12). El vector se inyectó directamente en el parénquima hepático y se procedió a continuación a la administración del inductor (*mifepristone*) durante 40 días. La toma del inductor produjo un aumento de IL-12 en el hígado reflejado en una elevación de la IL-12 sérica. La sobreexpresión de IL-12 se asoció a una marcada reducción de la carga viral en todos los animales en los que los valores basales de virus en sangre estaban por debajo de  $10^{10}$  genomas virales (gv)/ml. En contraste, en las marmotas con viremia superior a  $10^{10}$  gv/ml sólo se produjeron pequeñas variaciones en la carga viral. La respuesta al tratamiento se acompañó de la aparición de una respuesta inmune celular frente a los antígenos virales, indicando que la expresión intrahepática de IL-12 era capaz de romper la tolerancia frente al virus<sup>35</sup>. Dado que la carga viral en la infección crónica por VHB en humanos no excede habitualmente el límite de  $10^8$ , la terapia basada en la transferencia génica de IL-12 al hígado con vectores de larga expresión y promotores inducibles podría constituir un tratamiento eficaz, económico y de breve duración para la hepatitis crónica B. Uno de los atractivos de esta modalidad terapéutica es que los valores intrahepáticos de IL-12 son superiores a los valores séricos, con lo que se maximiza la acción terapéutica mientras que se reduce el riesgo de efectos secundarios sistémicos.

### Terapia génica de la cirrosis hepática

La cirrosis hepática es un proceso resultante de un daño del parénquima hepático mantenido en el tiempo que provoca una alteración en la estructura histológica del hígado por la

producción de tejido fibroso y la aparición de nódulos de regeneración<sup>35</sup>. Las consecuencias fisiopatológicas de la cirrosis hepática están vinculadas a la insuficiencia hepatocelular, por un lado, y la hipertensión portal, por otro. La persistencia de la actividad inflamatoria en el hígado se considera como una de las causas que predisponen al desarrollo de hepatocarcinoma (HCC) en la cirrosis hepática. En la actualidad, el tratamiento de la cirrosis hepática es el manejo/prevenición de las complicaciones y la práctica del trasplante hepático en las fases avanzadas de la enfermedad<sup>36</sup>. Sin embargo, la limitación de donantes junto con la existencia de contraindicaciones al trasplante por morbilidad o superación de los límites de edad, hace que el recambio de órganos sea aplicable sólo a una minoría de los pacientes con cirrosis hepática avanzada. Por ello, es urgente el desarrollo de tratamientos alternativos para este tipo de pacientes.

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la cirrosis es un proceso irreversible, evidencias recientes han mostrado que en algunos casos es posible la regresión de la lesión al cesar el daño<sup>37</sup>. La reversión se acompaña de una interrupción de la fibrogénesis y activación simultánea de la fibrólisis. La posibilidad de transferir al hígado genes codificantes de factores hepatoprotectores y antifibrogénicos ofrece perspectivas para nuevos tratamientos de la cirrosis hepática.

En estudios pioneros de la terapia génica de la cirrosis, autores japoneses mostraron en 1999 que la transducción del hígado cirrótico con vectores que expresaban HGF ocasionaba una marcada disminución de la fibrosis y una significativa mejoría de la función hepatocelular<sup>38</sup>. Otro transgén que es de potencial interés para el tratamiento de la cirrosis es la IGF-I. Esta hormona, que es producida por hepatocitos (y otras células) en respuesta a la hormona del crecimiento, ejerce potentes efectos anabolizantes y hepatoprotectores. En la cirrosis hepática los valores séricos de IGF-I se encuentran disminuidos, y llegan a ser indetectables en las fases avanzadas de la enfermedad<sup>39</sup>. Nuestro grupo ha mostrado que la administración de IGF-I recombinante a ratas cirróticas ocasionaba la reducción de la fibrosis y de la presión portal junto con una clara mejoría de la función hepática<sup>40,41</sup>. Los efectos beneficiosos del tratamiento con IGF-I en pacientes cirróticos también se evidenciaron en un ensayo clínico piloto en pacientes con cirrosis alcohólica en los que se observó una significativa elevación de la albúmina y descenso del índice Child-pugh<sup>42</sup>. En estudios más recientes en ratas con cirrosis inducida por administración de CCl<sub>4</sub> o por tioacetamida, se comprobó que la terapia génica con vectores virales SV40 que expresan IGF-I era capaz de revertir la cirrosis y mejorar significativamente la función hepática. Ello se acompañó de una disminución en la producción de factores profibrogénicos (incluyendo TGF- $\beta$  y PDGF) y de TIMP-1 y 2 junto con aumento de la expresión y actividad de metaloproteasas. Se observó que la expresión intrahepática de IGF-I inducía la producción de factores hepatoprotectores, como HGF, y disminuía la expresión de citocinas proinflamatorias (Sobrevals et al, *Hepatology* 2009, aceptado).

Es interesante anotar que tanto en el hígado sano como en el cirrótico, los hepatocitos no expresan receptor para IGF-I (IGFI-R), el cual sólo está presente en células no pa-

renquimatosas. La expresión de IGFI-R es prominente en los tractos fibrosos que rodean los nódulos de regeneración, indicando que IGF-I actúa sobre miofibroblastos y células del tejido cicatricial, induciendo en ellas la producción de factores de crecimiento capaces de orquestar un programa biológico de reparación tisular conducente a la disminución del tejido fibroso y mejorar la funcionalidad hepatocelular (Sobrevals et al, *Hepatology* 2010, en prensa).

Estos estudios llevados a cabo en ratas cirróticas apoyan la idea de que la cirrosis no es un proceso irreversible sino que, por el contrario, es una lesión susceptible de modulación con terapia biológica. Este cambio conceptual en el enfoque de la cirrosis hepática podría modificar en el futuro próximo su tratamiento de modo tan revolucionario como lo fue el trasplante hepático hace ya un cuarto de siglo.

### Terapia génica de los tumores primitivos y metastásicos del hígado

El cáncer primario de hígado es el sexto cáncer más común y el tercero en cuanto a número de muertes en el ámbito mundial. El tumor primitivo del hígado más frecuente es el HCC (80-90%), con más de 626.000 nuevos casos anuales y, en la actualidad, en el mundo constituye la cuarta causa de muerte por tumores malignos. Le sigue en frecuencia a gran distancia el colangiocarcinoma (CC)<sup>43</sup>. La frecuencia de ambos tipos de cáncer está aumentando en los últimos años<sup>44,45</sup>. El HCC se asienta frecuentemente en hígados cirróticos mientras que el CC aparece habitualmente sobre hígados no cirróticos. El primero es más común en varones mientras que en el segundo predominan las mujeres<sup>46,47</sup>.

En el tratamiento del HCC, la resección quirúrgica (o técnicas ablativas como la alcoholización o la radiofrecuencia) y el trasplante hepático son procedimientos potencialmente curativos en las fases tempranas de la enfermedad, y son aplicables a un número reducido de pacientes. En las lesiones mas extensas o con invasión vascular macroscópica (circunstancias clínicas habitualmente presentes en el momento del diagnóstico), sólo pueden utilizarse tratamientos paliativos como la quimioembolización, la radioembolización o el tratamiento biológico dianizado (p. ej., inhibidores de cinasas como el sorafenib)<sup>48,49</sup>. En estos pacientes, así como en los CC no resecables quirúrgicamente, la escasa supervivencia que se alcanza con los tratamientos actualmente disponibles hace necesaria la introducción de nuevos métodos terapéuticos capaces de controlar la progresión del tumor.

Tanto el HCC como el CC se desarrollan durante gran parte de su historia natural dentro del propio hígado, lo que también ocurre en otras neoplasias, como los tumores neuroendocrinos o las metástasis metacrónicas colorrectales. En todos estos casos, la terapia génica dirigida al hígado ofrece la oportunidad de actuar en el propio terreno donde el tumor crece, permitiendo modificar el microambiente tumoral y/o estimular la respuesta inmune frente al tumor<sup>50,51</sup>.

Las estrategias de terapia génica que se pueden adoptar frente al cáncer son diversas. Entre ellas cabe mencionar: a) la transferencia al tumor de genes supresores de tumores, como p53; b) la transducción del tumor con genes suicidas (codificantes para enzimas que transforman un fármaco

como el ganciclovir en un derivado altamente citotóxico); c) la transducción del tumor o del tejido alrededor del tumor con genes codificantes para citocinas inmunoestimuladoras; d) la transducción del tejido tumoral o peritumoral con genes que modifican el microambiente del tumor como, por ejemplo, moléculas con acción antiangiogénica, y e) la infección del tumor con virus replicativos oncolíticos. Para lograr eficacia clínica utilizando las 2 primeras modalidades terapéuticas sería necesario transducir la totalidad de las células tumorales, lo cual es imposible en la práctica. Resultan pues más atractivas las 3 últimas modalidades terapéuticas, que permiten un tratamiento antitumoral efectivo sin necesidad de transducir todas las células del tumor<sup>50</sup>.

- Inmunoterapia del cáncer de hígado basada en transferencia génica. Para la terapia génica de tumores hepáticos en modelos animales se han usado distintas citocinas y moléculas inmunoestimuladoras para inducir una respuesta inmune efectiva frente al tumor. En nuestro grupo hemos utilizado la IL-12 en ensayos clínicos en pacientes con tumores primitivos y metastásicos de hígado<sup>52</sup>. En estos estudios piloto el transgén se vehiculizó en un adenovirus de primera generación con promotor constitutivo. El vector se administró mediante inyección intratumoral directa con control ecográfico siguiendo un esquema de escalado de dosis. Cada paciente recibió 3 dosis del vector con una separación de 1 mes entre una y otra. El tratamiento fue bien tolerado, pero la eficacia fue escasa debido, en parte, a la brevedad de la expresión del transgén y al hecho de que la primera inyección del adenovirus indujera anticuerpos neutralizantes que bloquearon el efecto de las siguientes administraciones del vector. Los resultados de estos estudios indican que para el tratamiento del cáncer hepático se precisa usar vectores que posibiliten una larga reexpresión del transgén y emplear promotores inducibles que permitan regular su expresión de modo que se alcancen valores terapéuticos sin producir efectos adversos colaterales. Con el uso de estos vectores se ha podido obtener respuestas de hasta el 40% en animales transgénicos con HCC multifocal de muy difícil tratamiento<sup>53</sup>. Asimismo, se ha podido observar en modelos experimentales de tumores de colon metastásicos en hígado que hay una sinergia entre la terapia génica basada en IL-12 y la quimioterapia con oxaliplatino, lo que resulta prometedor como estrategia capaz de mejorar la eficacia del tratamiento quimioterápico estándar de estos procesos (González-Aparicio, artículo en preparación).
- Terapia génica para detener la progresión tumoral mediante la modificación del microambiente tumoral. El microambiente tumoral juega un papel capital en la progresión de la enfermedad. Sin la formación de nuevos vasos que aporten oxígeno y nutrientes no es posible el crecimiento del tumor. Además, el tejido tumoral precisa crear un ambiente que le permita escapar a las células efectoras de la respuesta inmune antitumoral. En la estroma del tumor abundan los linfocitos Treg y las células mieloides supresoras (MSC) que bloquean a las células T efectoras e inducen la conversión de células T *naïve* en T reguladoras. Tanto los Treg como las MSC son fuente de TGF- $\beta$  y de IL-10, 2 potentes citocinas inmunosupresoras

e inductoras de los Treg. Uno de los sistemas más potentes utilizados por el tumor para condicionar el microambiente es la vía Wnt, constituida por un conjunto de glucoproteínas que interacciona con un receptor en la membrana celular llamado Frizzled (Fz), el cual al activarse aumenta los niveles de beta-catenina libre en el citoplasma, permitiendo su paso al núcleo en donde interviene en la activación de genes que regulan la proliferación y sobrevivencia celular. Además, Wnt actúa por vía no canónica activando Rac, RhoA y fosfolipasa C, modulando la actividad del citoesqueleto y la expresión de una diversidad de genes que intervienen en el crecimiento y la diferenciación celular. La vía Wnt tiene una serie de sistemas de control como sFRP (proteína soluble relacionada con Fz) y Wif (*Wnt inhibitory factor*), que se unen a Wnt impidiendo su unión a Fz. Estudios de nuestro grupo han evidenciado que Wnt estimula la angiogénesis tumoral y que la expresión de sFRP y/o Wif utilizando vectores adenovirales impide la formación de nuevos vasos en modelos animales de HCC<sup>54</sup>. El empleo de vectores codificantes de sFRP o de Wif para la transducción del hígado tumoral constituye una estrategia muy atractiva para el tratamiento del HCC, máxime cuando se ha visto que Wnt puede resultar crítico para la diferenciación y expansión de Treg. Por tanto, los inhibidores de Wnt no sólo actuarían como antiangiogénicos, sino también como facilitadores de la respuesta inmune antitumoral.

- Viroterapia. Esta estrategia está basada en el uso de virus que replican y matan preferencialmente las células tumorales. Estas células se convierten además en fuente de nuevas partículas virales que infectan a las células cancerosas del entorno. Los vectores más comúnmente utilizados han sido los adenovirus. El primero de la serie, llamado ONYX-015, se basa en la delección del gen adenoviral *E1B* que hace a la replicación dependiente de la falta de p53 funcional. En los ensayos clínicos, este vector se administró a pacientes con tumores primarios y metastásicos del hígado, pero el efecto antitumoral fue ausente o muy limitado<sup>55</sup>. Estos pobres efectos terapéuticos se deben, en parte, a la fuerte respuesta inmune neutralizante que induce este tipo de vectores. Una estrategia que se está ensayando es el equipamiento de los adenovirus oncolíticos con genes capaces de estimular la inmunidad antitumoral (como la IL-12). En la actualidad, se están llevando a cabo estudios para determinar si este tipo de vectores son capaces de estimular respuestas inmunes antitumorales más efectivas<sup>56</sup>.

## Bibliografía

1. Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:711-38.
2. Douglas KL. Toward development of artificial viruses for gene therapy: comparative evaluation of viral and non-viral transfection. *Biotechnol Prog.* 2008;24:871-83.
3. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther.* 2006;13:1313-9.
4. Smith AE. Viral vectors in gene therapy. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:807-38.
5. Tolmachov O. Designing plasmid vectors. *Methods Mol Biol.* 2009;542:117-29.

6. Guo ZS, Li Q, Bartlett DL, Yang JY, Fang B. Gene transfer: the challenge of regulated gene expression. *Trends Mol Med*. 2008;14:410-8.
7. Imperiale MJ, Kochanek S. Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;273:335-57.
8. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:583-93.
9. Segura MM, Alba R, Bosch A, Chillón M. Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Curr Gene Ther*. 2008;8:222-35.
10. Vile RG, Russell SJ. Retroviruses as vectors. *Br Med Bull*. 1995;51:12-30.
11. Smith RH. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther*. 2008;15:817-22.
12. Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*. 2000;60:249-71.
13. Sandhu JS, Keating A, Hozumi N. Human gene therapy. *Crit Rev Biotechnol*. 1997;17:307-26.
14. Ribas A. Genetically modified dendritic cells for cancer immunotherapy. *Curr Gene Ther*. 2005;5:619-28.
15. Fiehn C, Wettschureck N, Krauthoff A, Haas R, Ho AD. Bone marrow-derived cells as carriers of recombinant immunomodulatory cytokine genes to lymphoid organs. *Cancer Gene Ther*. 2000;7:1105-12.
16. Kindler V, Suva D, Soulas C, Chapuis B. Haematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells as tools for present and future cellular therapies. *Swiss Med Wkly*. 2006;136:333-7.
17. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 2006;12:342-7.
18. Unzu C, Sampedro A, Mauleón I, Vanrell L, Dubrot J, De Salamanca R, et al. Porphobilinogen deaminase over-expression in hepatocytes, but not in erythrocytes, prevents accumulation of toxic porphyrin precursors in a mouse model of acute intermittent porphyria. *J Hepatol*. 2009. Epub ahead of print.
19. Hernández-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J. Gene therapy of liver cancer. *Ann Hepatol*. 2007;6:5-14.
20. Ávila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006;25:3866-84.
21. Qian C, Liu XY, Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach. *Cell Res*. 2006;16:182-8.
22. González-Aseguinolaza G, Crettaz J, Ochoa L, Otano I, Aldabe R, Paneda A. Gene therapy for viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6:1263-78.
23. Vera M, Sobrevals L, Zaratiegui M, Martínez L, Palencia B, Rodríguez CM, et al. Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. *Gene Ther*. 2007;14:203-10.
24. Prieto J, Fernández-Ruiz V, Kawa MP, Sarobe P, Qian C. Cells as vehicles for therapeutic genes to treat liver diseases. *Gene Ther*. 2008;15:765-71.
25. Badminton MN, Elder GH. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J Inher Metab Dis*. 2005;28:277-86.
26. Kauppinen R. Porphyrins. *Lancet*. 2005;365:241-52.
27. Grandchamp B. Acute intermittent porphyria. *Semin Liver Dis*. 1998;18:17-24.
28. Johansson A, Nowak G, Möller C, Blomberg P, Harper P. Adenoviral-mediated expression of porphobilinogen deaminase in liver restores the metabolic defect in a mouse model of acute intermittent porphyria. *Mol Ther*. 2004;10:337-43.
29. Johansson A, Nowak G, Möller C, Harper P. Non-viral delivery of the porphobilinogen deaminase cDNA into a mouse model of acute intermittent porphyria. *Mol Genet Metab*. 2004;82:20-6.
30. Lok AS. Navigating the maze of hepatitis B treatments. *Gastroenterology*. 2007;132:1586-94.
31. Yuan HJ, Lee WM. Molecular mechanisms of resistance to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B. *Curr Mol Med*. 2007;7:185-97.
32. Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest*. 1997;99:3025-33.
33. Berraondo P, Ochoa L, Crettaz J, Rotellar F, Vales A, Martínez-Ansó E, et al. IFN-alpha gene therapy for woodchuck hepatitis with adeno-associated virus: differences in duration of gene expression and antiviral activity using intraportal or intramuscular routes. *Mol Ther*. 2005;12:68-76.
34. Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13:104-24.
35. Crettaz J, Otano I, Ochoa L, et al. Treatment of chronic viral hepatitis in woodchucks by prolonged intrahepatic expression of interleukin-12. *J Virol*. 2009;83:2663-74.
36. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371:838-51.
37. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*. 2003;200:504-15.
38. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med*. 1999;5:226-30.
39. Fernández-Rodríguez CM, Prada I, Andrade A, et al. Disturbed synthesis of insulinlike growth factor I and its binding proteins may influence renal function changes in liver cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2001;46:1313-20.
40. Castilla-Cortázar I, García M, Muguerza B, et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997;113:1682-91.
41. Lorenzo-Zúñiga V, Rodríguez-Ortigosa CM, Bartolí R, et al. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut*. 2006;55:1306-12.
42. Conchillo M, De Knecht RJ, Payeras M, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol*. 2005;43:630-6.
43. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.
44. McGlynn KA, Tarone RE, El-Serag HB. A comparison of trends in the incidence of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1198-203.
45. Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;3:353-67.
46. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557-76.
47. Villa E. Role of estrogen in liver cancer. *Womens Health*. 2008;4:41-50.
48. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362:1907-17.
49. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42:1208-36.
50. Prieto J, Qian C, Hernández-Alcoceba R, González-Aseguinolaza G, Mazzolini G, Sangro B, et al. Gene therapy of liver diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4:1073-91.
51. Berraondo P, Prieto J, González-Aseguinolaza G. Advances in interleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases. *Curr Gene Ther*. 2009;9:62-71.

52. Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, et al. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol*. 2004;22:1389-97.
53. Zabala M, Lasarte JJ, Perret C, et al. Induction of immunosuppressive molecules and regulatory T cells counteracts the antitumor effect of interleukin-12-based gene therapy in a transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol*. 2007;47:807-15.
54. Hu J, Dong A, Fernández-Ruiz V, et al. Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69:6951-9.
55. Crompton AM, Kirn DH. From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7:133-9.
56. Bortolanza S, Bunuales M, Otano I, et al. Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. *Mol Ther*. 2009;17:614-22.